



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ANIMALI

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

TESI DI LAUREA

MONITORAGGIO DELLA CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINA B1 SU CAMPIONI DI MAIS RACCOLTI NELL'ANNO 2012 IN DIVERSE PROVINCE DEL VENETO

Relatore: **CH.MA PROF.SSA LUCIA BAILONI**

Correlatore: **DOTT.SSA LAURA MACCARANA**

Laureando: **MARA MINGONI**

Matricola n. 1010945

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

Indice

Riassunto	5
Abstract	7
1. Introduzione	9
1.1 <i>Produzione mondiale e italiana e destinazioni del mais</i>	9
1.2 <i>Morfologia della pianta e tecniche colturali</i>	10
1.3 <i>Tipi di funghi micotossinogeni ed effetti sulla salute umana e animale.....</i>	14
1.4 <i>Condizioni per lo sviluppo di micotossine in campo e durante lo stoccaggio.....</i>	17
1.5 <i>Controllo dello sviluppo fungino in fase di coltivazione, di raccolta e di stoccaggio</i>	20
1.6 <i>Aflatossine.....</i>	23
2. Obiettivi	29
3. Materiali e metodi.....	31
3.1 <i>Fonte dei dati</i>	31
3.2 <i>Modalità di prelievo dei campioni</i>	32
3.3 <i>Metodo d'analisi</i>	32
3.4 <i>Suddivisione in classi.....</i>	33
3.5 <i>Elaborazione statistica</i>	33
4. Risultati e Discussione.....	35
4.1 <i>Distribuzione dei campioni nelle diverse classi.....</i>	35
4.2 <i>Dati espressi in classi.....</i>	38
4.2.1 <i>Effetto della provincia e del comune sulla contaminazione da aflatossine B1.....</i>	38
4.2.2 <i>Effetto del periodo di raccolta</i>	40
4.3 <i>Dati espressi in valore</i>	44
4.3.1 <i>Effetto della provincia e del centro</i>	44
4.3.2 <i>Effetto del periodo di raccolta</i>	48
5. Conclusioni	51
Bibliografia.....	53

Riassunto

La presente Tesi di Laurea ha come scopo il monitoraggio del livello di contaminazione da parte dell'aflatossina B1 nei campioni di granella di mais raccolti tra agosto ed ottobre 2012 in diversi comuni delle province di Padova, Rovigo e Venezia. Il mais, in particolare in questa zona, riveste un ruolo fondamentale, sia per l'elevata quantità di prodotto ottenuto, sia per i suoi numerosi utilizzi, soprattutto in campo zootecnico come mangime, e dunque la caratteristica principale della granella deve essere la qualità.

In totale sono stati raccolti 1241 campioni dai centri di stoccaggio dei 21 comuni considerati e successivamente analizzati presso il laboratorio presente nella sede di Conselve (Padova) del Consorzio Agrario del Nord-Est, tramite il kit ELISA, basato sull'utilizzo di un saggio immunoenzimatico. Successivamente i risultati ottenuti sono stati elaborati sia come valori assoluti che come classi, suddivise secondo i valori limite stabiliti dall'Unione Europea.

È risultato che l'anno 2012 è stato particolarmente contraddistinto dall'elevato livello di aflatossina B1, soprattutto nella provincia di Padova, dove il livello di contaminazione è molto elevato, in quanto circa il 58% dei campioni supera il limite per l'utilizzo a scopo zootecnico di 20 ppb. Rovigo, al contrario, presenta il minor quantitativo di campioni che superano questo valore (circa il 4%). Dall'analisi è poi emerso che circa il 70% dei campioni non è utilizzabile né per l'alimentazione umana né per quella zootecnica, mentre solo 10% del totale può essere destinato al consumo umano.

Si è evidenziato inoltre come la provincia, il comune e il periodo di raccolta sono stati particolarmente significativi ($P < 0.001$) per determinare il livello di contaminazione per la suddivisione in classi, mentre per il quantitativo di aflatossina B1, espresso in ppb, il periodo non è risultato significativo ($P = 0.2860$; $P = 0.5276$), ma solamente l'effetto della provincia ($P < 0.001$) e del comune ($P < 0.001$).

Particolare è stato anche l'andamento del livello di contaminazione legato al periodo di raccolta, in quanto il contenuto di aflatossina B1 dovrebbe aumentare con l'aumento della permanenza in campo del mais, ma invece è stato abbastanza lineare per quanto riguarda la provincia di Padova e decrescente a Rovigo. Probabilmente questo andamento è da imputarsi al tempo medio di stoccaggio (circa 16 giorni) dei campioni di granella nel laboratorio di analisi.

Da questo studio è emerso quindi che le condizioni climatiche, soprattutto la temperatura e l'umidità sono il fattore determinante per lo sviluppo di funghi micotossinogeni sia in campo, che al momento della raccolta che in fase di stoccaggio. Infatti l'anno 2012 è stato caratterizzato

dalla forte siccità e dalle alte temperature, che hanno favorito lo sviluppo di muffe in tutte le aree destinate alla produzione di mais, non solo nella zona del Veneto sud-orientale considerata.

In conclusione si può affermare che, per migliorare la qualità igienico-sanitaria della granella, bisogna intervenire innanzitutto in campo, con l'adozione di pratiche agronomiche utili a tale scopo (le rotazioni, la giusta densità di semina, la scelta dell'ibrido più adatto, l'irrigazione e le concimazioni), ma anche successivamente durante la fase di stoccaggio. Infatti, com'è stato evidenziato nel presente lavoro, condizioni di conservazione in laboratorio non idonee oppure tempi di attesa per effettuare l'analisi troppo lunghi potrebbero aumentare in maniera rilevante il contenuto di muffe. A causa dei cambiamenti climatici e alla frequente combinazione di elevate temperature, umidità e siccità in queste aree vocate alla produzione di mais, è di grande importanza, dunque, monitorare frequentemente la produzione, e nel caso in cui la contaminazione sia troppo elevata per poter utilizzare efficacemente le tecniche di pulitura della granella, prevedere altri possibili utilizzi, come ad esempio la produzione del biogas o di altre forme di energia.

Abstract

Monitoring of B1 aflatoxin contamination in samples of corn grain harvested in 2012 in different areas of the Veneto region.

The aim of this Thesis was to monitor the B1 aflatoxin contamination level in the samples of corn grain harvested between August and October 2012 in different municipalities of the provinces of Padua, Rovigo and Venice. Corn, in particular in this area, is of great importance both for the considerable amount of product obtained from it and for its many uses, above all in relation to animal breeding as fodder. Therefore quality has to be the main characteristic of the corn grain.

1241 samples from storage centers of 21 districts examined were collected and subsequently analyzed at the laboratory of the North-East Agricultural Association (Conselve, Padova, Italy) by means of the kit ELISA based on the use of an “enzyme immunoassay”. The results obtained were elaborated both as absolute values and as classes, subdivided in accordance with the limit values established by the European Union.

The year 2012 was characterized by an high B1 aflatoxin level above all in the province of Padua, where the contamination level is very high. In fact about 58% of the samples exceeded the limit of 20 ppb when it is used for zootechnical purpose. Rovigo, on the contrary, showed the lowest amount of samples exceeding this threshold (about 4%). In accordance with the analysis about 70% of the samples cannot be used neither for human nutrition nor for animal feeding, while only 10% of the total amount can be intended for human use.

The province, the municipality and the harvest period have been particularly significant ($P < 0.001$) in order to determine the contamination level for the subdivision into classes, while for what concerns the quantity of B1 aflatoxin, expressed in ppb, the period has not been significant ($P = 0.29$; $P = 0.53$), whereas the province ($P < 0.001$) and the municipality ($P < 0.001$) exerted significant effects.

The trend of the contamination level connected to the harvest period has turned out to be peculiar too. The content of B1 aflatoxin should increase with the prolongation of the period of staying of corn in the field, but instead it has been fairly linear for what concerns the provinces of Padua and decreasing in Rovigo. Probably this trend was due to the average storage time (about 16 days) of the samples of corn grain in the analysis laboratory.

According to this study climatic conditions and most of all temperatures and humidity rates are the determinative factor in the development of micotossinogeni fungi both in the field

and during the storage. In fact the year 2012 has been characterized by a strong drought and high temperatures which favored the development of moulds in all areas intended for corn production and not only in the South Eastern Veneto area considered.

In short we can affirm that, in order to maintain the food safety of the corn grain, it is necessary to intervene first in the field with the adoption of agronomical practices useful to this purpose (rotations, proper density of sowing, choice of the most suitable hybrid, irrigation and fertilizations) and secondary during storage. In fact as the present work has been highlighting, the existence of unsuitable storage conditions in the laboratory or too long waiting times spent to carry out the analysis, could increase significantly the content of moulds. Because of the climate changes and the frequent combinations of high temperature, humidity and drought in these areas, it is of great importance the frequent monitoring of the production and if the contamination should be too high in order to use appropriately the methods to clean the corn, it is necessary to provide for other possible uses as for example the biogas production or other forms of energy.

1. Introduzione

1.1 Produzione mondiale e italiana e destinazioni del mais

Il mais (*Zea mays L.*) è tra i tre principali cereali coltivati a livello mondiale, dopo il frumento e il riso. Offre infatti vaste possibilità di utilizzo: è destinato sia all'alimentazione umana che animale, trova anche un grande impiego nel campo industriale, sia per scopi alimentari che non e in tempi recenti è diventato tra le materie prime fondamentali per la produzione di bioenergia. In particolare è utilizzato in alimentazione umana per la produzione di farine, fiocchi, granella oppure come glucosio, distillati, etanolo, olio, a seguito della trasformazione industriale; in zootecnia è utilizzato come pianta intera insilata, granella sfarinata, intera, fioccata, laminata o come pastone di granella (composto da granella e tutolo) o di pannocchia (composto dalla pannocchia intera con il cartoccio, macinata e insilata); nel campo industriale trova diversi utilizzi per la produzione, ad esempio, di carta, colla, resine, tessuti, amido, lettieri per gatti, prodotti farmaceutici, vernici, ceramiche ed esplosivi (Bonsembiante *et al.*, 1983).

Il mais è coltivato in tutto il mondo per le sue caratteristiche di adattabilità a svariate condizioni ambientali e la sua grande capacità produttiva. L'elevata resa è però legata alle moderne tecnologie produttive e all'impiego di ibridi altamente produttivi (Bonsembiante *et al.*, 1983).

L'anno 2012 ha visto però una drastica riduzione della produzione di mais, sia a livello mondiale, soprattutto negli Stati Uniti, che sono da sempre il principale produttore ed esportatore, sia nell'ambito europeo ed italiano in particolare. Gli Stati Uniti hanno visto una riduzione della produzione di circa 41 milioni di tonnellate, anche se restano i primi produttori mondiali anche per il 2012 (271.938.000 tonnellate), seguiti dalla Cina (200.000.000 tonnellate) e dal Brasile (70.000.000 tonnellate) (USDA, 2012). In Europa invece la produzione è attorno ai 55.612.000 tonnellate, con una riduzione di circa 11.000.000 di tonnellate rispetto all'anno precedente ed in particolare in Italia c'è stata una riduzione di circa 3 milioni di tonnellate rispetto al 2011 (ISTAT, 2012 e USDA, 2013). Questa contrazione della resa è stata causata principalmente dall'andamento climatico particolarmente sfavorevole, a causa della forte siccità e delle alte temperature e al conseguente sviluppo di micotossine che ha reso la maggior parte della produzione inutilizzabile per l'alimentazione animale e umana.

La produzione mondiale per l'anno 2011/2012 si aggira dunque attorno ad 883.540.000 tonnellate e 114.600.000 tonnellate per le esportazioni mondiali (Tabella 1).

Tabella 1. Produzione mondiale ed esportazioni di mais nel 2011/2012 (ISTAT, 2012 e USDA, 2013).

PRODUZIONE MONDIALE	ESPORTAZIONI MONDIALI
2011/2012	2011/2012
883.540.000 t	114.600.000 t

Per quanto riguarda l'Italia la produzione nel 2012 è diminuita del 12.9%, con una produzione raccolta di circa 8.489.725 tonnellate (Tabella 2).

Tabella 2. Produzione italiana del 2012 e variazione rispetto alla produzione del 2011 (CRPV, 2012).

PRODUZIONE ITALIANA	VARIAZIONE DELLA PRODUZIONE
2012	ITALIANA RISPETTO AL 2011
8.489.725 t	-12.9 %

In Italia i due terzi del quantitativo totale italiano di mais sono prodotti in Veneto, Lombardia, Piemonte e Friuli Venezia Giulia (Bonciarelli e Bonciarelli, 2001). In particolare in Veneto la produzione del 2012 è stata di 16.448.991 di quintali, con la seguente distribuzione (in quintali):

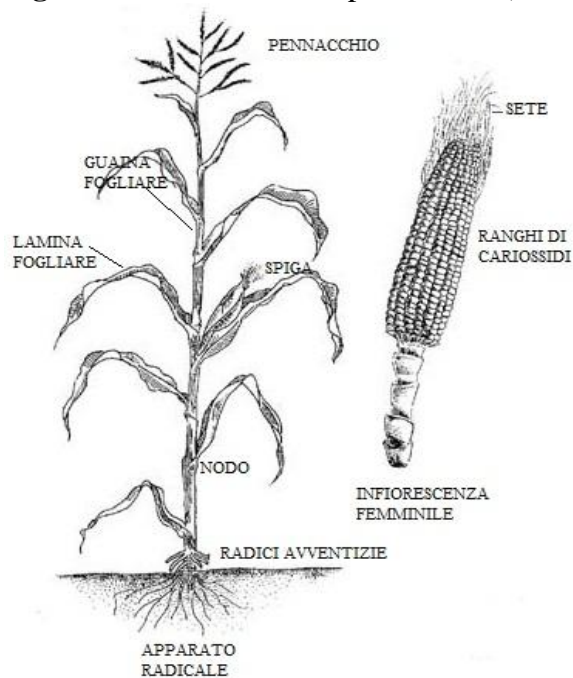
- VERONA: 2.481.287;
- VICENZA: 2.981.300
- BELLUNO: 190.000
- TREVISO: 3.075.000
- VENEZIA: 2.405.000
- PADOVA: 3.029.004
- ROVIGO: 2.350.400

La provincia con il maggior quantitativo prodotto risulta essere dunque Treviso, seguita da Padova e Vicenza, mentre Belluno presenta la produzione minore (Fonte: Istat, 2012).

1.2 Morfologia della pianta e tecniche colturali

MORFOLGIA. Il mais appartiene alla famiglia delle *Poaceae* e alla classe delle *monocotiledoni*.

Figura 1. Pianta di mais e pannocchia (Fonte: www.ducabruzzi.it).



La pianta di mais presenta:

- un *culmo* formato da una serie di *nodi* e *internodi* (dai 12 ai 24, a seconda delle caratteristiche ambientali e dalla disponibilità delle ore di luce giornaliere), con una lunghezza di circa 2-3 metri;
- da *foglie* (da 8-10 fino a 22-24) che si inseriscono a livello dei nodi e disposte in maniera alterna, molto larghe e

allungate, con una *lamina* espansa che presenta una pagina inferiore liscia mentre quella superiore può essere ondulata;

- a livello del culmo troviamo la *guaina*, che fa parte anch'essa della foglia e va ad avvolgere il fusto;
- i palchi di *radici avventizie* che si sviluppano da una serie di nodi basali. L'apparato radicale del mais è di tipo fascicolato, si sviluppa dunque in tutte le direzioni e può raggiungere una profondità che va da 1 metro fino ai 2 metri.

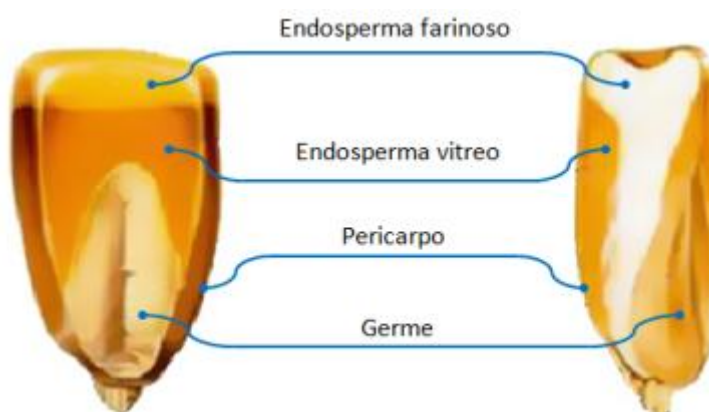
Il mais è una pianta monoica, dunque presenta sia i fiori maschili che quelli femminili riuniti sulla stessa pianta, ma portati da infiorescenze distinte. In particolare l'infiorescenza maschile è chiamata *pennacchio* e si trova all'apice della pianta, formato da tre stami, e può essere compatto, lasso, pendulo o eretto e produce fino a 25 milioni di granuli pollinici. L'infiorescenza femminile è portata sulla *spiga o spadice* che si trova tra l'ascella della 5^a e 6^a foglia. Le spighette sono inserite su un rachide, chiamato *tutolo*, in numero pari e disposte in *ranghi* (da 12 a 20). La spiga può contenere dai 200 fino ai 1000 semi e la fecondazione è di tipo prevalentemente anemofilo, ma è anche permessa dalla gravità e avviene non appena vengono emesse le sete dalle brattee (Maggiore *et al.*, 2007).

A seguito della fecondazione inizia la fase di maturazione delle cariossidi, passando dalla maturazione latteia, in cui le sostanze di riserva hanno una consistenza lattiginosa con un 70% di

umidità, alla maturazione cerosa con il 40-45% di umidità e con l'inizio dell'ingiallimento della pianta e rappresenta il momento ideale per la raccolta per l'insilamento, e infine alla maturazione fisiologica, in cui la pianta smette di accumulare sostanze di riserva e raggiunge un 30% di umidità. La *cariosside* è un frutto secco indeiscente, inserita tramite un *pedicello* nel tutolo e avvolta dai resti delle glume. La cariosside è costituita internamente dall'*embrione*, cioè la nuova pianta che rappresenta circa il 10% del peso, l'*endosperma* che contiene le sostanze di riserva ed è circa un 85% del peso totale e infine, esternamente, si trova il *pericarpo* con il pedicello che costituisce una protezione per l'embrione e l'endosperma ed circa il 5% del peso.

La cariosside è caratterizzata da un elevato contenuto di amido (70-75%) presente sottoforma di granuli, da un basso contenuto di proteine (10%), da oli (4%) di buona qualità per la presenza di acidi grassi insaturi come l'acido oleico, circa un 30%, e l'acido linoleico, circa un 55%, e infine da ceneri (1%) (Maggiore *et al.*, 2007).

Figura 2. Morfologia della cariosside di mais.



A seconda delle caratteristiche della cariosside vengono distinte diverse varietà di mais, tra cui, le più importanti sono:

- mais farinoso (*zea mays indentata*): ha circa un 30% di amilosio e un 70% di amilopectina, altamente produttivo e usato in zootecnia e per l'industria;
- mais vitreo (*zea mays indurata*): caratterizzato dall'elevato contenuto di zeaxantina, quindi usato per i polli da carne e le galline ovaiole per accentuare la colorazione giallastra della pelle, dei tarsi e del tuorlo dell'uovo;
- mais amilosico (*zea mays amylacea*): con un elevato contenuto di amilosio, dal 50 all'80%, usato in amideria;
- mais cereo (*zea mays ceratina*): usato nell'industria tessile e cartiera perché contiene fino al 99% di amilopectina;

- mais dolce (*zea mays saccharata*): destinato all'alimentazione umana, perché ricco di zuccheri semplici e povero di amido, e rientra anche nei piani di lotta contro la Piralide;
- mais da scoppio (*zea mays everta*): con la caratteristica di estrarre l'endosperma se sottoposto ad una fonte di calore, usato per la produzione di pop-corn.

Il ciclo produttivo del mais ha una durata variabile, che può essere dai 90 ai 145 giorni, a seconda della classe di precocità utilizzata: infatti dalla FAO sono state individuate 9 classi di precocità, dalla 100 alla 900, ognuna delle quali corrisponde ad una lunghezza del ciclo ben definita e a particolari caratteristiche pedo-climatiche, ma anche alla particolare destinazione del prodotto finale, perché ad esempio nel caso della produzione di granella si useranno classi più precoci, mentre per la produzione del silomais classi più tardive.

Il mais è una pianta macroterma e brevidiurna. Ha necessità di temperature elevate per tutto il suo ciclo vitale, che vanno dai 22 ad un massimo di 30°C. E' inoltre necessario un buon apporto idrico per ottenere un'elevata produzione, poiché l'ambiente ideale per il mais sarebbe caratterizzato da estati con piogge frequenti e regolari. Può però adattarsi a vari ambienti purché abbiano un'elevata quantità di nutrienti prontamente disponibili e assimilabili (Bonciarelli e Bonciarelli, 2001).

TECNICA COLTURALE. Il mais è considerato una coltura da rinnovo per la profondità delle radici, per l'apporto di nutrienti tramite le concimazioni organiche e per le lavorazioni profonde che richiede. Generalmente il terreno, per la preparazione alla semina, viene lavorato con profondità attorno ai 40-45 cm, utile soprattutto se il terreno è argilloso per una buona costituzione di riserve idriche. Non richiede lavorazioni particolarmente accurate a causa della profondità di semina, anche superiore rispetto a quella comune di 3 cm, e per il fatto che il seme è grosso. La semina si effettua in primavera, o quando le temperature rimangono stabili attorno ai 12°C. E' importante considerare anche la giusta densità di semina, sia per quanto riguarda il tipo di produzione che si vuole ottenere, sia per la sua qualità, generalmente è di circa 7-9 piante/m². La semina è completamente meccanizzata: si semina con seminatrice di precisione con una distanza tra le file di 75 cm e profondità attorno ai 3-5 cm, usando seme conciato per prevenire infestazioni e attacchi da parte di insetti. Al momento della semina, e successivamente anche parte in copertura, si distribuiscono le concimazioni azotate (sottoforma di nitrato o ammoniaca) e fosfatica e nel caso di terreni carenti si apporta anche potassio. Inoltre il mais è in grado di usare al meglio i principi nutritivi già presenti nel terreno (Maggiore *et al.*, 2007).

Il controllo delle infestanti si effettua mediante sarchiatura, quando le dimensioni della coltura lo permettono, e diserbo in pre-emergenza o in post-emergenza. Il diserbo di pre-emergenza resta la tecnica più utilizzata, si fa contemporaneamente alla semina o comunque prima che il mais nasca, localizzato sulla fila. Per controllare meglio le malerbe si può accompagnare alla sarchiatura la rincalzatura, usando anche attrezzi accoppiati.

In Italia risulta indispensabile anche l'irrigazione per ottenere buone produzioni sia quantitativamente che qualitativamente, perché la maggior parte del suo ciclo si svolge in periodi secchi con la minima piovosità. L'irrigazione generalmente si esegue con sistemi ad aspersione o per infiltrazione laterale da solchi. Il periodo di massima sensibilità agli stress idrici inizia circa 15 giorni prima della fioritura e arriva fino alla fecondazione, e una condizione di carenza idrica in questo periodo può determinare una contrazione della resa anche del 60% (Maggiore *et al.*, 2007).

Il sistema più diffuso per la raccolta è l'utilizzo della mietitrebbia con testata spannocchiatrice, che contemporaneamente effettua la raccolta e la sgranatura. Si raccoglie ad umidità attorno al 24-26%, generalmente nel periodo compreso da settembre ad ottobre. I residui colturali che rimangono nel campo, come steli, foglie, cartocci e tutoli vengono interrati o raccolti con raccogli-imballatrice e usati come foraggio, lettiera o combustibile (Bonciarelli e Bonciarelli, 2001).

1.3 Tipi di funghi micotossinogeni ed effetti sulla salute umana e animale

I principali funghi in grado di produrre micotossine appartengono essenzialmente a tre generi: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. All'interno di questi tre generi esistono però delle specie che risultano essere utili per l'uomo, dunque senza nessun effetto nocivo, come ad esempio l'*Aspergillus oryzae* e l'*Aspergillus soyae* (usati in Oriente per la produzione di sakè e salsa di soia e in tutto il mondo per ricavare enzimi necessari all'industria alimentare), al contrario dell'*Aspergillus flavus* che risulta invece essere tra i più nocivi sia per l'uomo che per gli animali (Causin, 2006).

I prodotti di questi tre generi, chiamati anche muffe, sono appunto le micotossine, cioè dei prodotti che derivano dal metabolismo secondario con effetti acuti o cronici sulla salute degli organismi viventi (Battilani *et al.*, 2006).

Il mais è un ospite che presenta caratteristiche adatte per la diffusione di tutti e tre i generi, ma in particolare per il genere *Aspergillus* e *Fusarium*, i quali producono le micotossine riportate in Tabella 3.

Tabella 3. Principali funghi micotossinogeni responsabili della produzione di micotossine nei cereali (Fonte: Agronomica, 3/2006).

FUNGHI	MICOTOSSINE PRODOTTE
GENERE ASPERGILLUS	
A.flavus	Aflatossine B1, B2, acido ciclo piazonico
A.parasiticus	Aflatossine B1,B2, G1 e G2.
A.ochraceus (A.alutaceus)	Ocratossina A, citrinina, acido penicillio.
GENERE FUSARIUM	
F.graminearum, F.culmorum, F.poaе, F.sporotrichioides	Tricoteceni (DON, nivalenolo, diacetossiscirpenolo, tossina T-2), zearalenone.
F.verticillioides (moniliforme), F.proliferatum	Fumonisine

La produzione di micotossine è strettamente legata alle condizioni termo-igrometriche, cioè alla temperatura e all'umidità, in quanto sono i due fattori principali che intervengono nell'attività metabolica, in maniera diretta, ma possono anche agire indirettamente ponendo la pianta in condizioni di stress, e quindi più suscettibile ad attacchi fungini. La condizione di stress può anche essere dovuta alle particolari tecniche agronomiche utilizzate.

Ogni micotossina ha un particolare effetto tossico:

- Aflatossina B1: genotossico, cancerogeno, epatotossico, immunosoppressore;
- Ocratossina A: nefrotossico, teratogeno, immunosoppressore, cancerogeno;
- Fumonisine B1: neurotossico, cancerogeno, citotossico;
- Tricoteceni: immunosoppressore, dermatotossico, emorragico;
- Zearalenone: estrogeno simile (Battilani *et al.*, 2006).

In particolare l'aflatossina B1, oggetto di studio in questo lavoro di Tesi, ha un elevato potenziale epatotocarcinogeno, in quanto interferisce sullo sviluppo e la proliferazione delle cellule epatiche, provocando anche cirrosi epatica (Sarasin e Moulé, 1975).

Può inoltre colpire tutti gli animali, anche se si registra una diversa sensibilità tra individui, ma non esistono specie che non ne subiscano gli effetti (Gerald e Wogan, 1999).

L'*Aspergillus* può inoltre causare vari problemi di natura respiratoria, in caso di frequenti inalazioni, come ad esempio aspergillosi broncopolmonare allergica (ABPA), aspergilloma e aspergillosi polmonare cronica, sinusite o aspergillosi invasiva (www.aspergilus.org.uk, 2012).

Per quanto riguarda gli animali, questi particolari problemi possono essere imputati alle micotossine se si nota che gli animali non rispondono alle cure antibiotiche oppure le patologie non risultano essere contagiose o sono malattie che appaiono solo in determinati periodi, che coincidono con la somministrazione di alimenti contaminati (Rosiles, 1986).

Inoltre, negli animali, in caso di intossicazioni croniche, si riscontrano anche sintomi aspecifici come ad esempio, diminuzione delle performance produttive, diminuzione dell'ingestione, pelo ruvido e opaco, diarrea, diminuzione della resa al macello e di conseguenza anche della qualità dei prodotti (Naceur Haouet e Altissimi, 2003). Possono anche comportare una riduzione della motilità ruminale, delle presenza dei batteri cellulosolitici e della produzione AGV (acidi grassi volatili) e di conseguenza una minore efficienza dell'utilizzo dell'alimento (www.agriok.it, 2003).

A causa dell'elevata tossicità delle micotossine, l'Unione Europea ha stabilito dei limiti di legge per quanto riguarda il livello di contaminazione degli alimenti destinati sia all'alimentazione animale che umana (Reg. CE n.165/2010).

In riferimento ai limiti posti dall'Unione Europea, è stata effettuata una suddivisione in classi nel lavoro di Tesi, a seconda del livello di contaminazione, che viene riportata nella Tabella 4.

Tabella 4. Range (ppb) per la suddivisione in classi.

CLASSE	1	2	3	4	5	6
RANGE (ppb)	<1	1-2	2-5	5-20	20-40	>40

Il valore limite per destinare il prodotto al consumo umano è di 2,0 ppb (Reg. CE n.1881/2006), quindi vi rientrano i campioni delle classi 1 e 2. Oltre la classe 2, e dunque oltre il valore di 2,0 ppb, il prodotto non può essere destinato al consumo umano. Possono invece essere destinate al consumo umano partite che rientrano nella classe 3, quindi tra 2 e 5 ppb, se vengono sottoposte a trattamenti opportuni per ridurre il contenuto di aflatossina B1.

Il valore limite per destinare il mais ad uso zootecnico è invece di 20 ppb (Reg. CE n.1881/2006), dunque fino alla classe 4. Oltre questo valore il mais non può essere usato a scopo zootecnico, ma può essere indirizzato ad altri usi come biogas, biocombustibile, biodisel oppure essere sottoposto a trattamenti per ridurre il tenore di alfatossine.

Nel latte il valore limite per l'aflatossina M1, fissato dalla normativa europea, è di 5,0 ppb, (Reg. CE n.1881/2006) dunque entro la classe 3. Superato questo valore, non è possibile destinare il latte al consumo umano né è consentita la commercializzazione diretta. Inoltre per il latte è definita anche una soglia di attenzione di 4,0 ppb, a causa dell'alta tossicità dell'aflatossina M1, per consentire l'applicazione di interventi efficaci prima che la tossicità diventi troppo elevata.

In caso di superamento del valore limite il latte verrà destinato alla distruzione o ad utilizzi alternativi come produzione di biomassa o biocombustibile, o trattamenti chimici come l'idrolisi ad alta pressione o idrolisi alcalina (Reg. CE n.1881/2006; Circolare del Ministero della Salute, 2013), in quanto non può essere trattato come rifiuto speciale, né smaltito in concimaia (Pietri *et al.*, www.aia.it).

Inoltre, il 14 settembre 2012, il Ministero della Salute ha inviato a diversi enti una circolare, al fine di aumentare i controlli e limitare i rischi alla salute sia animale che umana causati dalle micotossine, richiamando l'attenzione su:

- L'applicazione delle buone prassi igieniche in tutte le operazioni;
- Il controllo dell'applicazione delle normative europee, leggi comunitarie e nazionali nella produzione di mangimi;
- L'adozione di buone prassi di coltivazione, raccolta e conservazione del mais;
- Puntuale applicazione dell'autocontrollo e intensificazione delle analisi;
- Creazione di piani per il controllo del latte per garantire sicurezza nelle produzioni lattiero-casearie.

1.4 Condizioni per lo sviluppo di micotossine in campo e durante lo stoccaggio

Le condizioni climatiche, in particolare la temperatura e l'umidità o acqua libera (a_w) sono tra i fattori fondamentali per lo sviluppo di micotossine, assieme al pH del substrato colturale, presenza di infestazioni e alle tecniche colturali.

La *temperatura* è il fattore predisponente, e generalmente le temperature ottimali di sviluppo sono comprese tra i 15 e i 30°C (Naceur Haouet e Altissimi, 2003). Si è però dimostrato anche che il 73% delle contaminazioni nel mais avviene con temperature comprese tra i 32 e i 38°C e solo meno del 7,5% tra i 21 e i 26°C (Gorman e Kang, 1991), quindi esistono specie che tollerano temperature anche superiori. Il genere *Aspergillus* può infatti adattarsi a temperature anche maggiori, poiché presenta sia caratteristiche di mesofilia che di termofilia ed è presente soprattutto con condizioni di caldo-umido o climi tropicali e può tollerare temperature anche di

oltre 50°C (Naceur Haouet e Altissimi, 2003). Le fumonisine e lo zearalenone, invece, si sviluppano in condizioni di clima temperato e secco, con temperatura attorno ai 14°C (www.mondolatte.it, 2013). Questo particolare effetto della temperatura sulla crescita fungina è dovuto al fatto che con elevate temperature la pianta si accresce e si sviluppa e questo comporta un elevato consumo idrico, di nutrienti e ad un aumento del tasso di evaporazione e dunque potrebbe trovarsi in condizioni di stress nel caso in cui ci sia qualche carenza di uno dei fattori fondamentali per la sua crescita (Lillehoj, 1986).

L'altro parametro che maggiormente condiziona la possibilità di sviluppo delle micotossine è *l'umidità ambientale o acqua libera (a_w)*: lo sviluppo di funghi e la sintesi di tossine risulta essere bassa se l'umidità ambientale è inferiore all'85%, ma inizia già ad essere significativa con umidità dall'86 all'87%, fino a raggiungere i livelli massimi attorno al 95% (Gormane Kang, 1991). L' a_w è definita come rapporto tra la pressione di vapore di un substrato rispetto all'acqua pura e, a seconda del diverso comportamento delle specie fungine, in base alla disponibilità di acqua, vengono distinte in:

- Igrofile: le spore germinano a valori di a_w maggiori a 0.90, con crescita ottimale attorno a 1.00;
- Mesofile: la germinazione delle spore avviene con valori di a_w compresi tra 0.80 e 0.90, con l'ottimo di crescita attorno a 0.95 e 1.00;
- Xerofile: le spore germinano a valori di a_w inferiori a 0.80 e la crescita ottimale è attorno a valori di 0.95.

Si può dire che più un substrato ha bassi livelli di a_w meno ci sarà acqua disponibile per la crescita fungina (www.mondolatte.it,2013). Il livello minimo di a_w che permette la crescita fungina è di 0.61, anche se generalmente per la sintesi di micotossine sono necessari livelli superiori. La disponibilità di acqua nel substrato dipende anche da altri fattori come la temperatura, perché il valore limite per l' a_w , affinché ci sia la sintesi di tossine, sarà tanto più basso quanto la temperatura si avvicinerà a quella ottimale per lo sviluppo della specie fungina (Naceur Haouet e Altissimi, 2003). Nella Tabella 5 vengono riportate le condizioni ottimali di sviluppo delle principali micotossine, considerando l'intervallo di temperatura e la temperatura ottimale, l'umidità relativa dell'aria e l'umidità relativa della granella.

Tabella 5. Condizioni di sviluppo delle principali micotossine (Fonte: Mais e sicurezza alimentare, 2006).

Fungo produttore	A.flavus; A.parasiticus	A. ochraceus; Penicilliums.p.	F. graminearum; culmorim; F.sporotrichioides	F.verticillioides (moniliforme); proliferatum
Condizioni di sviluppo :				
Temperatura dell'aria, °C	10-42 Opt. 32	5-35 Opt. 28	4-35 Opt. 25	4-36 Opt. 25
Umidità relativa, %	82	>80	94	91
Umidità granella, %	16-30	16-20	21	18-20

Altri due parametri da considerare sono il *pH* e l'*ossigeno* del substrato. Lo sviluppo di tossine avviene generalmente con pH compresi tra 4 e 8, anche se alcune specie di funghi sono in grado di tollerare e quindi produrre tossine anche a pH più bassi o più alti, modificando dunque l'acidità dell'alimento. Inoltre, generalmente, le micotossine sono *organismi aerobi* (hanno bisogno di almeno l'1-2% di ossigeno) e dunque si sviluppano sulla superficie del substrato, dove è maggiormente presente ossigeno. Anche in questo caso alcune specie possono adattarsi a vivere più in profondità o su substrati liquidi o in atmosfera modificata, in presenza di anidride carbonica e azoto molecolare.

La natura del substrato, infine, risulta essere un altro fattore predisponente, in quanto si è notato che le micotossine si sviluppano in presenza di elevate quantità di amido e di zinco, soprattutto per quanto riguarda le aflatossine. Per questo i prodotti vegetali come mais, arachidi e semi di cotone risultano essere i prodotti più a rischio per quanto riguarda la contaminazione da aflatossine (Naceur Haouet e Altissimi, 2003).

In conclusione, le condizioni che favoriscono lo sviluppo di micotossine in campo sono l'umidità (>70%), forti escursioni termiche tra il giorno e la notte, temperature attorno ai 25-30°C, forti piogge poco prima della raccolta, lesioni alla granella e presenza di pH adatti e ossigeno (www.mondolatte.it, 2013).

Anche al momento dello stoccaggio possono svilupparsi o diffondersi le tossine. Si sviluppano generalmente se i prodotti sono stati conservati o manipolati con poca cura al momento della raccolta ed essiccazione o al momento dell'insilamento. Anche qui possono

essere evidenziati alcuni aspetti su cui porre particolare attenzione: la *temperatura*, l'*acqua libera*, il *tempo di permanenza* prima dell'essiccazione nel cumulo, il *periodo e le condizioni di stoccaggio*. In generale si può dire che i funghi del genere *Fusarium*, e relative tossine prodotte (ad esempio zearalenone, vomitossina), si sviluppano prevalentemente in campo, mentre quelli del genere *Aspergillus* e *Penicillium* e le tossine a loro associate (aflatossina, ocratossina) vengono prodotti prevalentemente durante lo stoccaggio. È necessario infatti mantenere un'umidità di conservazione attorno al 13%, se il periodo di stoccaggio è di 3 mesi, oppure abbassarla di 2 o 3 punti con periodi di conservazione maggiori, mantenendo una temperatura tra i 15 e i 20°C, avendo cura di essiccare il cumulo di prodotto raccolto possibilmente entro le 24 ore (Causin, 2013). Il pH e le condizioni di anaerobiosi, come ad esempio accade negli insilati, non sono tuttavia risolutive, perché, nonostante il potenziale di sopravvivenza ridotto, alcune muffe possono svilupparsi in condizioni per loro considerate limite. Possono infatti svilupparsi se il pH della massa insilata risulta essere troppo elevato e sono presenti batteri che contrastano le fermentazioni lattiche, oppure se l'entrata dell'aria al momento dell'apertura del silos è rilevante. Generalmente le muffe contenute negli insilati appartengono al genere *Fusarium*, e dunque sono presenti zearalenone, deossinivalenolo e tossina T-2 (Naceur Haouet e Altissimi, 2003).

Poiché il controllo delle micotossine nei foraggi al momento dello stoccaggio risulta essere molto difficoltoso e a causa del fatto che i trattamenti previsti e consigliati non sono sempre efficienti, è dunque necessario una buona tecnica di prevenzione durante la fase di coltivazione e di raccolta per prevenire la diffusione di funghi micotossinogeni.

1.5 Controllo dello sviluppo fungino in fase di coltivazione, di raccolta e di stoccaggio

Ai fini di minimizzare la concentrazione di micotossine nel mais è di fondamentale importanza adottare diverse strategie sia in fase di coltivazione che al momento della raccolta e, infine, durante lo stoccaggio, dato che gli interventi di decontaminazione e pulitura non sono sempre efficaci oltre concentrazioni elevate ed, inoltre, sono molto costosi.

Le buone pratiche agricole per la prevenzione e il controllo delle aflatossine riguardano l'intervento su alcuni punti fondamentali: rotazioni, lavorazioni del terreno e scelta dell'ibrido, tecnica di semina, concimazione e irrigazione, difesa contro i parassiti, raccolta nel momento adeguato, sistema di conservazione e decontaminazione (Bugiani, 2013; Causin, 2013).

ROTAZIONI. L'avvicendamento colturale riduce la contaminazione causata dai funghi che permangono nei residui colturali, evitando dunque l'infestazione di altre colture che possono presentare caratteristiche simili al mais. Per questo il mais non dovrebbe tornare sullo stesso

terreno prima di 3 anni. Inoltre la rotazione garantisce una buona difesa dalla diffusione della Diabrotica e altri parassiti che possono danneggiare la pianta e la cariosside.

LAVORAZIONE DEL TERRENO E SCELTA DELL'IBRIDO. Prima della semina occorre effettuare una buona sistemazione del terreno per facilitare la crescita delle piante, ponendo particolare attenzione ad una buona gestione dei residui colturali. Bisogna favorire la regimazione delle acque in eccesso per evitare ristagni e, ad esempio, apportare adeguate correzioni in presenza di terreni sciolti, perché la particolare tessitura, in caso di siccità e assenza di irrigazione, può causare stress alla pianta che quindi risulta più suscettibile agli attacchi fungini. Importante è poi l'adeguata scelta dell'ibrido, a seconda delle condizioni pedo-climatiche e alle tecniche agronomiche utilizzabili (Causin, 2013). L'ibrido inoltre deve presentare particolari caratteristiche come ad esempio una cariosside resistente alle rotture e dura, brattee che coprono interamente la spiga e spighe senza portamento eretto in fase di maturazione (Mosca, 2006).

TECNICA DI SEMINA. In condizioni climatiche favorevoli, l'ideale è effettuare una semina tempestiva per permettere la maturazione della pianta prima del raggiungimento delle massime temperature estive, soprattutto dove l'acqua è un fattore limitante, condizioni necessarie allo sviluppo fungino. Importante inoltre è la giusta densità di semina, non superiore a 7 piante/m², perché densità elevate provocano un maggior stress alla pianta a causa della scarsa disponibilità idrica e dell'elevata umidità che si crea all'interno della coltura (Mosca, 2006).

CONCIMAZIONE E IRRIGAZIONE. La concimazione è essenziale per evitare stress nutrizionali alla coltura, soprattutto è fondamentale una buona ed equilibrata concimazione azotata, evitando gli eccessi e preferibilmente interrando i fertilizzanti.

L'irrigazione resta uno dei fattori fondamentali da regolare per il controllo delle micotossine. Si deve irrigare a seconda dei fabbisogni della coltura, in quanto sia le carenze che gli eccessi risultano dannosi. Tale pratica però ha effetto solo sulla prevenzione dello stress idrico, ma non va a mitigare i problemi causati dalle alte temperature (Causin, 2013).

DIFESA CONTRO I PARASSITI. Esiste una correlazione tra lo sviluppo delle aflatossine e l'infestazione delle Piralide, dunque il trattamento chimico contro di essa permette una diminuzione del rischio di contaminazione di micotossine e si presenta più efficace rispetto al trattamento con fungicidi. I trattamenti devono essere mirati soprattutto verso la seconda generazione di larve e la loro efficacia dipende anche da molteplici fattori come ad esempio il momento di somministrazione, il tipo di insetticida, il tipo di ibrido, le condizioni climatiche e il livello di infestazione (Furlan e Duso, 2006).

RACCOLTA. Per limitare la diffusione fungina è utile raccogliere con umidità maggiori del 22%, meglio se compresa tra il 22 e il 24%, perché, infatti, oltre il 25% di umidità il mais risulta essere più suscettibile agli attacchi fungini (Sauer, 1986). È consigliabile dunque effettuare una trebbiatura tempestiva usando mietitrebbie a flusso assiale poiché riducono i rischi di possibili lesioni alla granella. È importante adottare basse velocità d'avanzamento, un'adeguata ventilazione per eliminare le particelle più piccole, generalmente più contaminate, e utilizzare macchine sempre pulite dopo ogni operazione.

Se possibile, poi, individuare la zona del campo che ha subito un maggior stress e, al momento della raccolta, tenerla separata dal resto delle granella (Bonino e Gaspari, 2006).

È fondamentale, inoltre, fare in modo che tutte le operazioni siano effettuate il più rapidamente possibile, per poter essiccare velocemente la granella, effettuare la pulitura e l'analisi in laboratorio prima che si possa verificare un aumento del livello di contaminazione o un possibile sviluppo dei funghi micotossinogeni (Bugiani, 2013).

POST-RACCOLTA E STOCCAGGIO. La granella deve sostare in cumulo per massimo 24 ore se le temperature sono superiori ai 26-28°C, al massimo 48 ore quando sono inferiori (Reyneri *et al.*, 2003).

Occorre poi portarla all'umidità di conservazione stabilita per la granella di mais, cioè del 13% se lo stoccaggio è di breve durata (minore di 3 mesi), oppure, in caso di contaminazioni gravi o periodi di stoccaggio oltre i 6 mesi, occorre diminuire l'umidità di 2 o 3 punti, avendo cura di pulire la granella prima dell'operazione (Causin, 2013).

Durante l'essiccazione bisogna fare attenzione a non creare danni alla granella, anche per le particolari condizioni che si creano all'interno dell'essiccatoio: infatti si riscontra un aumento della temperatura e del vapore acqueo, creando le condizioni ideali per lo sviluppo di funghi micotossinogeni. L'ideale sarebbe dunque essiccare la granella a basse temperature (dai 15 ai 20°C) o con ventilazione usando aria a temperatura ambiente. Questo però richiede molto più tempo per raggiungere l'umidità di conservazione e dunque espone la granella a maggiori rischi di attacchi fungini (Sauer, 1986).

Al termine del processo di essiccazione si esegue una seconda pulitura per l'allontanamento di polveri, impurità, granella danneggiata o di piccole dimensioni, seguita da un rapido raffreddamento con un refrigeratore per portarla a temperature inferiori ai 20°C e poi gradualmente si continua a diminuire la temperatura, fino al raggiungimento di quella di conservazione compresa tra 5 e 8°C (Reyneri *et al.*, 2003).

La granella deve poi essere conservata in silos a torre che la mantengano in continuo movimento e che consentano il prelievo a campione per effettuare i controlli e, infine, si riesegue la pulitura ad ogni operazione di movimentazione della massa. I silos, alla fine di ogni stagione, vengono disinfettati e sanitizzati, usando insetticidi specifici, fumiganti, esche e rodenticidi autorizzati (Bonino e Gaspari, 2006; Reyneri *et al.*, 2003).

DECONTAMINAZIONE CHIMICA E ALTRE TECNICHE. La decontaminazione o detossificazione chimica si può effettuare solo se il prodotto è destinato all'alimentazione animale. I vari metodi che possono essere adottati prevedono l'utilizzo di acido propionico, anidride solforosa, sali, formaldeide e ammoniaca (Sauer, 1986). Attualmente sono però proibiti dall'Unione Europea.

Il trattamento con ammoniaca è il più diffuso ed efficace perché può essere utilizzato sia a basse temperature e pressioni che, al contrario, a temperature di 70-120°C con pressioni elevate (Bertocchi *et al.*, 2012), ma sono necessari locali adeguati e una perfetta esecuzione per ottenere dei buoni risultati (Moss, 1998). Inoltre un uso eccessivo di ammoniaca può alterare le caratteristiche qualitative del foraggio, soprattutto per quanto riguarda la frazione proteica, andando ad aumentare il contenuto totale di azoto e riducendo la quantità di lisina (Lillehoj e Wall, 1986).

Questi trattamenti non sono però molto utilizzati a causa della possibile presenza di sostanze nocive nel prodotto finito, dell'alterazione delle sue caratteristiche nutrizionali e per i costi elevati.

Esistono anche molti altri tipi di trattamenti, oltre a quelli chimici:

- Trattamenti fisici, tra cui estrazione con solventi, adsorbimento con l'uso di carboni attivi, bentonite, argille, zeoliti e alluminosilicati, inattivazione con calore o irradiazione (Bertocchi *et al.*, 2012);
- Trattamenti biologici, che prevedono l'utilizzo di microrganismi che producono acidi in grado di metabolizzare e inattivare le aflatossine, quindi batteri, muffe, lieviti, piante e loro derivati (Bertocchi *et al.*, 2012).

1.6 Aflatossine

Le aflatossine sono prodotti del metabolismo secondario di alcune specie di funghi del genere *Aspergillus*. Sono note circa 18 diverse aflatossine, ma le più importanti e conosciute, anche per la loro vasta diffusione e alta tossicità, sono le tossine prodotte dall'*Aspergillus flavus*, cioè la B1 e la B2, e quelle dell'*Aspergillus parasiticus*, cioè le aflatossine G1 e G2. Sono state

scoperte negli anni Sessanta in Inghilterra, a seguito della comparsa di una patologia sconosciuta nei tacchini, denominata “malattia X del Tacchino” (“Turkey X disease”), la quale ha aperto una nuova area di indagine e ricerca nel settore agricolo (Lillehoj, 1986), che ha portato alla scoperta di queste quattro diverse aflatossine denominate con la lettera B o G a seconda della colorazione che assumono al momento dell’esposizione alla luce ultravioletta (B= *blue*, blu e G= *green*, verde).

Queste aflatossine si sviluppano su substrati ricchi di carboidrati e oli, quindi principalmente sul mais, le arachidi, il lino, il cocco e la palma (www.agriok.it, 2003).

Le aflatossine vengono inoltre classificate dall’IARC (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro), a seconda della tossicità che hanno per l’uomo, in:

- Gruppo 1: cancerogene per l’uomo;
- Gruppo 2a: probabilmente cancerogene per l’uomo;
- Gruppo 2b: possibilmente cancerogene per l’uomo;
- Gruppo 3: non classificabile come cancerogena per l’uomo (www.iarc.fr).

Le condizioni ottimali per lo sviluppo delle aflatossine sono temperature comprese tra 25 e 32°C e un contenuto di acqua libera (a_w) tra 0.82 e 0.87, in stagioni con temperature superiori alla media e con scarsa piovosità (Brera, 2012).

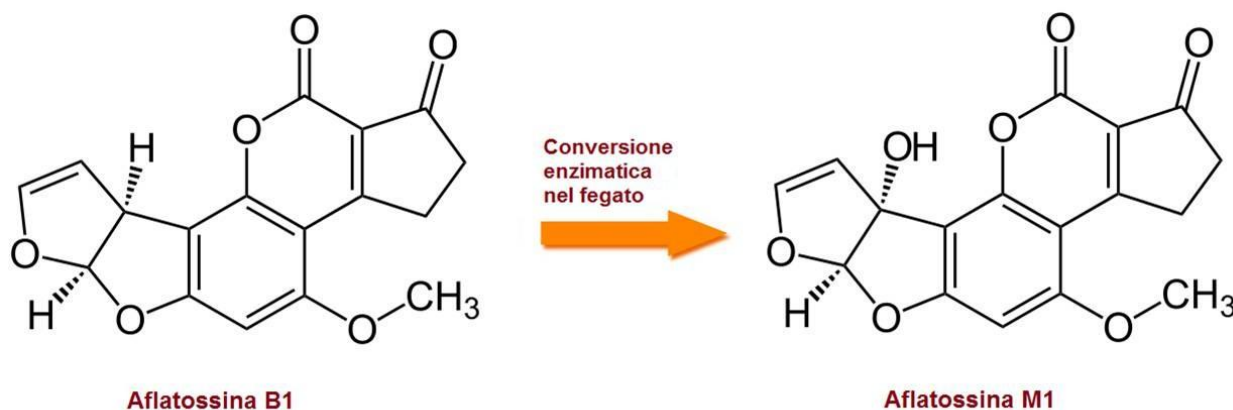
L’aflatoxina B1 risulta essere la più tossica sia per l’uomo che per gli animali e causa danni a livello epatico, provocando l’insorgenza di forme tumorali epatiche, cirrosi epatica, proliferazioni anomale delle cellule dei dotti biliari, emorragie a livello gastrointestinale, danni ai reni e diminuzione delle difese immunitarie con l’alterazione delle risposte immunitarie e antinfiammatorie (Naceur Haouet e Altissimi, 2003). Per questo motivo, nel 1993, l’Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro l’ha collocata all’interno del Gruppo 1, quindi cancerogena per l’uomo (Brera, 2012).

CARATTERISTICHE DELL’AFLATOSSINA B1:

- Rapido assorbimento a livello intestinale per il basso peso molecolare;
- Elevato tasso di passaggio (*carry-over*) nel latte e nelle urine;
- Accumulo prevalentemente nel fegato;
- Molto stabili ai trattamenti termici (Barbiero, 2012).

L'aflatossina B1, inoltre, viene metabolizzata a livello epatico a seguito di un processo di detossificazione effettuato tramite una reazione di idrossilazione, e diventa aflatossina M1 che viene eliminata nel latte, perché più facilmente trasportabile nel circolo sanguigno.

Immagine 3. Trasformazione dell'aflatossina B1 in aflatossina M1 (<http://blog.studenti.it/tecnoalimenti/micotossine-termoresistenti-nel-latte/>).



Negli animali che hanno consumato un alimento contaminato dall'aflatossina B1, si riscontra come metabolita anche nelle urine dopo la trasformazione in aflatossina P1, nelle feci e in parte viene eliminata anche tramite i succhi biliari (Rosiles, 1986).

L'infezione da *Aspergillo* è possibile notarla anche in campo, osservando la spiga: infatti, soprattutto nella porzione apicale più frequentemente, ma anche a livello della base, si presentano muffe granulose e di colorazione verdastra o giallastra, che si sviluppano ulteriormente durante la conservazione, specie se le condizioni non sono ottimali. L'infezione può arrivare anche più in profondità, fino al tutolo, che assume la stessa colorazione, ma nel caso in cui l'infezione sia di minima entità può non presentare muffe, ma conferire una colorazione anomala alle cariossidi (Causin, 2006).

Figura 4. Marciume da Aspergillo sulla spiga.



Figura 5. Mais affetto da aflatossine (www.agricoltura24.com).



Figura6. Cariossidi di mais danneggiate da Aspergillo.



AFLATOSSINA M1. L'aflatossina M1 (*milk toxin*), viene eliminata nel latte a seguito dell'ingestione di alimenti contenenti l'aflatossina B1. Nella vacca da latte si stima un *carry-over*, cioè un tasso di passaggio, attorno allo 0.2-5%, con un valore medio del 3%. Le aflatossine si ritrovano nel latte tra le 12 e le 36 ore dopo l'ingestione dell'alimento contaminato, legate alla frazione proteica del latte, e dunque possono essere riscontrate anche nei prodotti di trasformazione come formaggi o altri latticini, anche se la pastorizzazione e la sterilizzazione le inattivano parzialmente e scompaiono dopo 24 ore circa che l'alimento è stato tolto dalla dieta dell'animale (Bailoni, 2000).

L'aflatossina M1 è stata classificata dall'IARC (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro) all'interno del gruppo 3 per quanto riguarda la sua tossicità.

Il *carry-over* nel latte risulta però essere molto variabile e dipende da molti fattori: dall'animale, dal tipo di alimento, dalla fase della lattazione e da possibili infezioni a livello della mammella. Infatti, oltre l'elevata variabilità individuale, si verifica una maggiore eliminazione della tossina dall'inizio della lattazione fino al picco e soprattutto con l'aumento del numero delle cellule somatiche, a causa della perdita di efficienza della barriera ematomammaria. Dipende molto anche dal tipo di alimento ingerito, in quanto il passaggio è rilevante ad esempio con l'ingestione di cotone e mais (www.agriok.it, 2003).

E' possibile inoltre stimare la quantità di aflatossina M1 contenuta nel latte prodotto dalla mandria, conoscendo la quantità di aflatossina B1 ingerita quotidianamente da ogni capo (in ppb), tramite la seguente equazione:

$$AFM1(ppt \text{ nel latte}) = 1.19 \times (ppb \text{ di AFB1 ingeriti/capo/giorno}) + 1.9$$

dove *ppt* significa parti per trilione, quindi nanogrammi/kg (ng/kg) e *ppb* significa parti per miliardo, quindi microgrammi/kg (µg/kg) (Pietri *et al.*, www.aia.it).

In caso di utilizzo di alimenti contaminati, dunque, è di grande importanza monitorare il latte ogni 15 giorni e preventivamente effettuare un'analisi degli alimenti presso laboratori certificati. È possibile anche limitare il passaggio di tossine nel latte attraverso l'uso di sequestranti, miscelati all'alimento, come ad esempio bentonite, alluminosilicati, zeoliti, sepioliti e carbone attivo. Queste sostanze sono infatti in grado di legarsi all'aflatossina B1, impedendone l'assorbimento e il successivo passaggio nel latte e sono consigliate quando il livello di contaminazione del latte è molto vicino al limite consentito di 5 ppb (Pietri *et al.*, www.aia.it),

anche se la loro reale efficacia non è ancora stata dimostrata, in quanto non hanno ancora trovato un grande impiego.

Inoltre, può essere utile anche la somministrazione all'animale di estratti di lieviti, che proteggono la mucosa intestinale, garantendone l'integrità e quindi prevenendo il passaggio di tossine. Possono essere utilizzati anche: la vitamina E in quanto, ha funzione antiossidante che mantiene l'integrità della barriera ematomammaria e di quella intestinale; lo zinco in forma organica che riduce il livello di cellule somatiche nel latte e svolge un'azione sinergica assieme alla vitamina E; l'ossido di zinco, che stimola il mantenimento e la rigenerazione della mucosa intestinale; ed il solfato di calcio e zolfo, con funzione micostatica e detossificante a livello epatico (www.agriok.it, 2003).

2. Obiettivi

L'obiettivo di questo lavoro di Tesi è stato quello di monitorare la contaminazione da parte dell'aflatossina B1 nei campioni di granella di mais raccolti in 21 comuni di tre diverse province del Veneto (Padova, Rovigo e Venezia), nel trimestre compreso tra agosto ed ottobre 2012.

I campioni sono stati raccolti presso i centri di stoccaggio dei Consorzi Agrari dei rispettivi paesi ed analizzati nel laboratorio di analisi presente presso la sede di Conselve (Padova) del Consorzio Agrario del Nord-Est, tramite l'utilizzo del kit ELISA, basato sull'allestimento di un saggio immunoenzimatico per la determinazione dell'aflatossina B1. In seguito, considerando i risultati ottenuti per quanto riguarda il livello di contaminazione, i campioni sono stati suddivisi in classi, tenendo presente i valori limite per le destinazioni del mais stabiliti dall'Unione Europea ed è stato analizzato l'effetto della provincia, del comune e del periodo di raccolta sulla distribuzione in classi e sul livello di contaminazione (in ppb).

3. Materiali e metodi

3.1 Fonte dei dati

I dati sono stati ottenuti durante l'attività di tirocinio presso il Consorzio Agrario del Nord Est, nei mesi di Agosto, Settembre e Ottobre 2012. L'attività del Consorzio è legata ad un confronto costante e costruttivo tra clienti, soci e organizzazioni agricole, prestando attenzione alle trasformazioni sociali, economiche e ambientali, cercando di operare nell'interesse e al servizio delle persone che vi si rivolgono per poter arricchire e operare al meglio nella propria attività.

L'attività di analisi si è svolta presso il laboratorio della sede di Conselve (PD), in via Prima Strada, n° 1/3.

I dati sono stati raccolti e ordinati per la successiva elaborazione statistica, suddividendoli per provincia, comune, data di raccolta del campione, data d'analisi e livello di Aflatossina B1 (ppb).

In particolare, nel trimestre da Agosto ad Ottobre 2012, sono state prese in considerazione le 3 province di Padova, Rovigo e Venezia, rispettivamente con 917 (73,89%), 215 (17,32%) e 109 (8,78%) campioni, per un totale di 1241 campioni analizzati.

Nella provincia di Padova sono stati analizzati 10 comuni (Abano, Conselve, Correzzola, Este, Maserà, Montagnana, Montemerlo, Piacenza d'Adige, Pozzonovo e Stanghella), nella provincia di Rovigo 7 comuni (Adria, Ariano Polesine, Canda, Crespino, Gaiba, Loreo e Porto Viro) e nella provincia di Venezia 4 comuni (Brondolo, Campagna Lupia, Cavarzere e Dolo).

Il comune con il più alto numero di campioni analizzati è Maserà, con 322 campioni (25,95%), seguito da Conselve con 300 campioni (24,17%) e Crespino con 96 campioni (7,74%).

Inoltre il trimestre in cui è stata realizzata l'analisi è stato suddiviso in ulteriori 3 sottoperiodi di raccolta, ognuno di circa 15 giorni:

- periodo 1: dal 16/08/2012 al 31/08/2012;
- periodo 2: dal 01/09/2012 al 14/09/2012;
- periodo 3: dal 15/09/2012 al 30/09/2012.

In questo modo è stato possibile valutare anche la distribuzione dei campioni raccolti suddividendoli entro provincia e per periodo di raccolta.

3.2 Modalità di prelievo dei campioni

La principale fonte d'errore nel test analitico è data dallo scorretto metodo di campionamento, in quanto la distribuzione delle micotossine non è omogenea nel cumulo di granella da analizzare, ma a macchia di leopardo, e dunque è necessario che la quantità del campione da analizzare rispecchi il più possibile quella del campione iniziale. A questo proposito, la Commissione Europea ha emanato il Regolamento CE n.401/2006, relativo al corretto metodo di campionamento e analisi per il controllo del livello di micotossine.

Affinché la procedura di campionamento sia eseguita in maniera corretta occorre che:

- la massa iniziale sia suddivisa in tante sottopartite, per poterle trattare separatamente;
- il numero di campioni elementari deve essere proporzionale al peso della partita iniziale (per esempio una partita tra 300 e 1500 t verrà divisa in 3 sottopartite, dalle quali saranno prelevati 100 campioni elementari, riuniti poi per ottenere un campione globale di 10 kg);
- i campioni elementari devono poi essere riuniti in un campione globale da cui prelevare la quantità necessaria ai fini dell'analisi, dopo un accurata miscelazione.

3.3 Metodo d'analisi

L'analisi è stata effettuata presso il laboratorio presente nella sede di Conselve (PD) del Consorzio Agrario del Nord Est, seguendo la procedura definita dal kit ELISA per la determinazione quantitativa dell'aflatossina B1.

La procedura d'analisi prevede diverse fasi:

- preparazione dei campioni e filtrazione;
- preparazione delle soluzioni di lavoro e applicazione della procedura d'analisi;
- calcolo dei risultati attraverso cromatografo.

Il campione deve essere miscelato accuratamente per renderlo il più omogeneo possibile. Deve essere, in seguito, macinato finemente e ancora una volta miscelato. Successivamente si prelevano 5g di campione a cui viene aggiunto 1g di NaCl, addizionando poi il tutto con 25ml di metanolo al 70% in acqua distillata o deionizzata. Si agita poi il tutto vigorosamente per 3 minuti e si prosegue infine con la filtrazione e la raccolta del filtrato.

Il saggio immunoenzimatico per la determinazione dell'aflatossina B1 viene poi effettuato su una micropiastra in polistirene adsorbita con anticorpi anti-aflatossina B1. Precedentemente si mescolano i reagenti in una micropiastra inerte di premiscelazione prima di trasferirli in quella con gli anticorpi. In questa piastra si mescolano secondo una sequenza precisa il coniugato enzimatico, gli standard e i campioni, il tutto viene poi miscelato per 3

volte e trasferito nella piastra con gli anticorpi. Qui avviene una prima competizione tra le molecole di aflatossine contenute nei campioni e negli standard e quelle legate all'enzima per gli stessi siti di legame dell'anticorpo anti-aflatossina adsorbito ai pozzetti della piastra.

Si esegue poi il lavaggio della micropiastra per eliminare ciò che non si è legato in maniera specifica alla fase solida.

Si aggiunge una soluzione di substrato cromogeno incolore, convertito dall'enzima in un prodotto di reazione colorato.

Viene bloccata poi la reazione enzimatica: lo sviluppo del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di aflatossina B1 nello standard o campione.

Infine si misura l'assorbanza con un lettore colorimetrico per micropiastre.

3.4 Suddivisione in classi

I risultati ottenuti sono poi stati suddivisi in 6 classi, a seconda del contenuto di aflatossina B1, ai fini dell'analisi statistica:

1. classe 1 : <1 ppb (limite minimo di rilevabilità del kit ELISA);
2. classe 2 : tra 1 e 2 ppb;
3. classe 3 : tra 2 e 5 ppb;
4. classe 4 : tra 5 e 20 ppb;
5. classe 5 : tra 20 e 40 ppb;
6. classe 6 : >40 ppb (limite massimo di rilevabilità del kit ELISA).

La ripartizione in classi tiene in considerazione i limiti stabiliti dal Regolamento CE n° 1881/2006 del 19 dicembre 2006 e della successiva modifica riportata nel Regolamento CE n° 165/2010 del 26 febbraio 2010.

3.5 Elaborazione statistica

I dati dei livelli di aflatossina B1 espressi in classi sono stati sottoposti ad analisi statistica di tipo descrittivo (media, numerosità, frequenze) valutando la distribuzione delle diverse classi e delle diverse classi entro provincia. Per questi stessi dati è stata effettuata l'analisi della varianza mediante PROC GLM (SAS) considerando l'effetto della provincia e dei comuni. Utilizzando un data set ridotto dei dati di aflatossina B1 espressi in classi, relativo solo ad alcuni comuni (scelti in base alla maggiore variabilità dei dati) delle provincie di Padova e Rovigo, è stata effettuata un'analisi della varianza (PROC GLM, SAS) considerando l'effetto della provincia, dei comuni, del periodo di raccolta e alcune interazioni

(interazione tra le provincie ed il periodo di raccolta, interazione tra i comuni ed il periodo di raccolta). La durata di stoccaggio dei campioni in laboratorio, è stata sottoposta ad elaborazione valutando l'effetto della provincia, del periodo di raccolta e la loro interazione.

Per quanto riguarda i dati sulla contaminazione dei campioni di mais con l'aflatossina B1, espressi in ppb, è stata effettuato un editing dei dati prima di sottoporli ad analisi statistica: sono infatti stati esclusi i campioni delle classi 1 (<1 ppb) e 6 (>40 ppb), in quanto non erano dei dati puntuali, ma rappresentavano i limiti minimo e massimo dello strumento utilizzato per l'analisi (kit ELISA). Dopo questa pulizia dei dati, è stata effettuata l'analisi della varianza mediante la PROC GLM (SAS) considerando l'effetto della provincia e dei comuni e della loro interazione. Su un data set più ridotto, è stata effettuata l'analisi della varianza mediante la PROC GLM (SAS) considerando l'effetto dei comuni, del periodo di raccolta e della loro interazione.

4. Risultati e Discussione

4.1 Distribuzione dei campioni nelle diverse classi

I valori di aflatossina B1 sono stati suddivisi in 6 classi, a seconda dei limiti di legge indicati dall'Unione Europea, come è stato precedentemente spiegato nella parte di Materiali e Metodi. La classe 6, cioè oltre il limite massimo di rilevabilità del kit d'analisi utilizzato (> 40 ppb), risulta essere la più numerosa, ed in particolare, si può notare che oltre il 70% dei campioni analizzati (classe 5 e classe 6) non possono essere destinati all'alimentazione animale, poiché superano il limite previsto di 20 ppb. Per quanto riguarda invece l'utilizzo del mais per l'alimentazione umana possono essere utilizzati i campioni che rientrano nelle classi 1 e 2, cioè fino ad un valore massimo di 2 ppb, che risultano essere circa il 10% del totale. Circa il 7% dei campioni rientra nella classe 3, cioè tra i 2 e i 5 ppb, e può essere destinato a cernita o a trattamenti per la riduzione del livello di contaminazione prima di destinarlo al consumo alimentare. Il 10% dei campioni contiene dai 5 ai 20 ppb e dunque può essere destinato al consumo animale ma non a quello umano (Reg. CE n.165/2010) (Tabella 6).

Tabella 6. Distribuzione in classi dei campioni analizzati.

CLASSE	RANGE (ppb)	NUMEROSITÀ	PERCENTUALE
1	<1	69	5.56
2	1-2	65	5.24
3	2-5	83	6.69
4	5-20	136	10.96
5	20-40	84	6.77
6	>40	804	64.79
<i>totale</i>		1241	100

Queste percentuali risultano essere nettamente in contrasto con i risultati raccolti nel lavoro di Tesi di Soldà G., riguardanti gli anni 2009, 2010 e 2011 in diverse province del Veneto, Friuli Venezia-Giulia ed Emilia-Romagna. In quegli anni, infatti, circa l'83% dei campioni risultava essere utilizzabile per l'alimentazione umana, il 6% da sottoporre a cernita o a trattamenti, il 9% era utilizzabile per l'alimentazione zootecnica e solamente un 2 % non era idoneo né al consumo umano né animale (Soldà, 2012).

Un ulteriore confronto può essere effettuato con i risultati ottenuti dal laboratorio ARAV nel periodo dal 25 agosto 2012 al 18 febbraio 2013 (www.arav.it). Si è infatti osservato che i campioni positivi, con una contaminazione che supera i 20 ppb, sono circa il 35%, con un contenuto medio di aflatossina di 34,3 ppb. Questo valore però risulta essere molto inferiore rispetto ai risultati raccolti nel lavoro di tesi, poiché è pari alla metà.

Questi dati sono inoltre paragonabili a quelli raccolti da Rizzi N., provenienti dal laboratorio analisi dell'Associazione Allevatori nel periodo compreso tra il 2000 e il 2005 riguardanti il territorio lombardo, nei quali vengono messi in evidenza gli anni 2003 e 2005, particolarmente problematici per il livello di contaminazione da aflatossine. Nel 2003 su 945 campioni analizzati più dell'11% risultavano superare il limite di 20 ppb consentito nei mangimi, e nel 2005 su 251 campioni, più del 12% superano questo valore, rimanendo però al di sotto del grado di contaminazione della granella di questo lavoro di Tesi (Rizzi, 2006).

Infine, anche Reyneri A. ha messo in evidenza la grave situazione dell'anno 2003, dove la maggior parte dei campioni di mais, provenienti da una coltura irrigua con un'inadeguata concimazione azotata, presentavano valori medi di aflatossina B1 compresi tra i 25 e i 30 ppb (Reyneri, 2008).

Gli anni compresi tra il 2005 e il 2008 risultano avere invece un numero molto contenuto di campioni che superano i limiti di legge. Infatti da quello che emerge dalle analisi del laboratorio agroalimentare ARAL, solamente l'8% dei campioni analizzati supera il limite di 20 ppb, mentre il 48% è al di sotto del limite di rilevabilità (Rizzi, 2008).

Considerando poi la distribuzione in classi nelle tre province di Padova, Rovigo e Venezia, si può notare che la ripartizione delle classi è maggiormente rappresentata dalla classe 6, oltre il limite di rilevabilità del kit d'analisi (Tabella 7). In particolare la provincia di Padova è quella che contribuisce maggiormente ad aumentare il livello di aflatossina B1, aumentando dunque la quantità di mais non utilizzabile a scopo zootecnico. Infatti circa il 58% dei campioni raccolti nella provincia di Padova superano il limite di 20 ppb.

Tabella 7. Distribuzione in classi nelle province.

PROVINCIA	CLASSI (percentuale)					
	1	2	3	4	5	6
PADOVA	2.01	2.82	3.55	7.41	4.35	53.75
ROVIGO	1.85	1.13	1.29	0.81	0.64	3.06
VENEZIA	1.69	1.29	1.85	2.74	1.77	7.98

Figura 6. Disposizione dei comuni considerati ai fini della prova.



Dalla cartina riportata nella Figura 6, si può notare come i comuni considerati risultino essere abbastanza vicini tra loro, concentrati in una zona ben precisa (sud-est del Veneto), anche se distribuiti tra tre diverse province, quindi con caratteristiche pedoclimatiche che influiscono sullo sviluppo del fungo abbastanza simili.

4.2 Dati espressi in classi

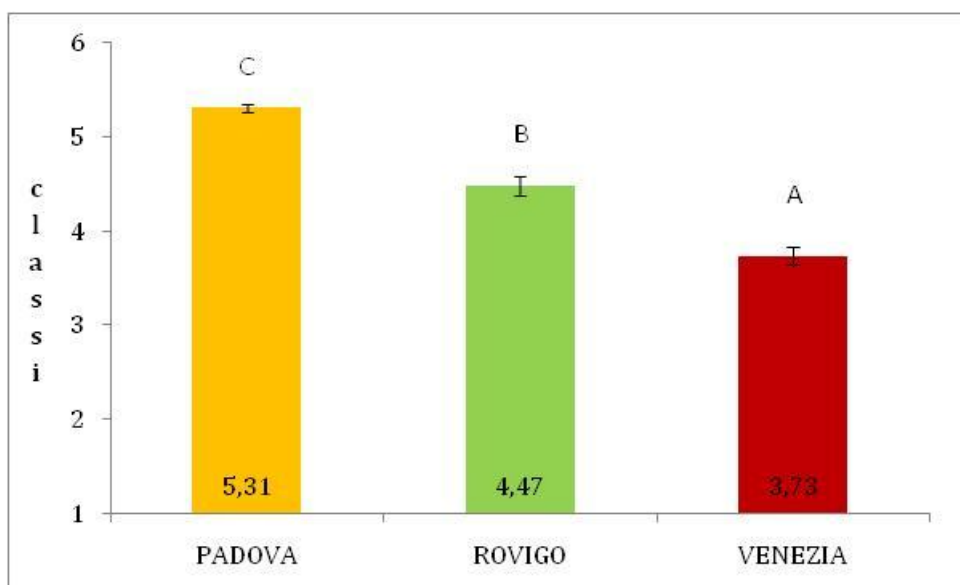
4.2.1 Effetto della provincia e del comune sulla contaminazione da aflatossine B1

Tabella 8. ANOVA relativa all'effetto della provincia.

	GL	VARIANZA	P
PROVINCIA	2	160.03	<0.001
ERRORE	1238	2.13	<0.001

Dall'analisi della varianza si è notato che l'effetto della provincia risulta essere particolarmente significativo ($P < 0.001$) per quanto riguarda la distribuzione delle classi (Tabella 8).

Grafico 1. Effetto della provincia sulla distribuzione in classi.



Le tre province di Padova, Rovigo e Venezia risultano essere statisticamente diverse per quanto riguarda la distribuzione in classi (Grafico 1). Padova presenta il maggior livello di contaminazione e i campioni sono compresi tra la classe 5 e la classe 6, seguita da Rovigo con i campioni compresi tra la classe 4 e la classe 5 e infine Venezia con i campioni compresi tra la classe 3 e la classe 4.

In seguito è stato considerato anche l'effetto del comune, che è risultato essere particolarmente significativo ($P < 0.001$) per la distribuzione in classi (Tabella 9).

Tabella 9. ANOVA relativa all'effetto del comune.

	GL	VARIANZA	P
COMUNE	20	31.26	<0.001
ERRORE	1220	1.19	<0.001

Per quanto riguarda la distribuzione in classi nei diversi comuni analizzati, si riporta la Tabella 10, che raggruppa i comuni a seconda della provincia in cui si trovano e permette di identificare le classi di appartenenza di ognuno.

Come riportato precedentemente, la provincia di Padova risulta avere il maggior numero di comuni che rientrano tra le classi 4 e 6, a Rovigo sono compresi per la maggior parte tra la classe 3 e 5, mentre i comuni della provincia di Venezia rientrano in media tra la classe 3 e 4.

Tabella 10. Distribuzione in classi nei comuni considerati.

PROVINCIA	COMUNE	LSMEAN	ERRORE STANDARD
PADOVA	ABANO	5.58	0.14
	CONSELVE	5.11	0.08
	CORREZZOLA	4.78	0.20
	ESTE	5.50	0.98
	MASERA'	5.74	0.08
	MONTAGNANA	4.46	0.22
	MONTEMERLO	4.50	0.28
	PIACENZA D'ADIGE	4.10	0.44
	POZZONOV	5.06	0.19
	STANGHELLA	5.36	0.29
ROVIGO	ADRIA	4.71	0.26
	ARIANO POLESINE	4.33	0.80
	CANDA	5.40	0.62
	CRESPINO	4.77	0.14
	GAIBA	4.33	0.36
	LOREO	3.69	0.24
	PORTO VIRO	4.14	0.23
VENEZIA	BRONDOLO	2.80	0.19
	CAMPAGNA LUPA	4.74	0.21
	CAVARZERE	3.57	0.52
	DOLO	6.00	0.69

4.2.2 Effetto del periodo di raccolta

Per analizzare ulteriormente la distribuzione in classi, sono stati successivamente identificati tre diversi periodi di raccolta, come già riportato in Materiali e Metodi.

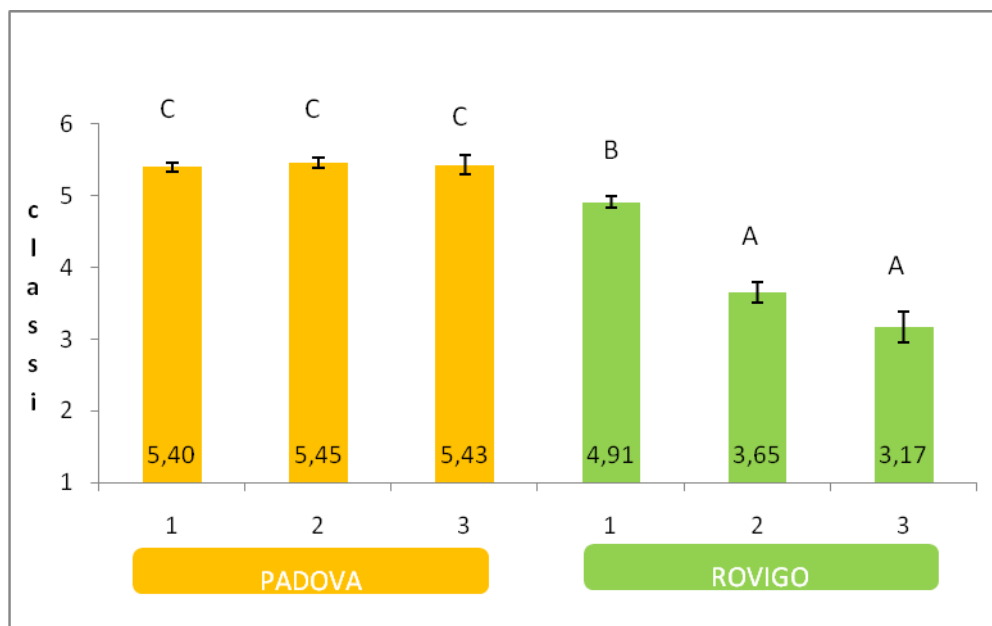
Nell'analisi dell'influenza del periodo di raccolta sulla distribuzione in classi è stata esclusa la provincia di Venezia, in quanto manca di variabilità per quanto riguarda il periodo di raccolta dei campioni.

È risultato che sia la provincia che il periodo sono molto significativi ($P < 0.001$) per quanto riguarda la variabile considerata e, dunque, è stata utilizzata l'interazione tra i due parametri, che risulta anch'essa particolarmente significativa ($P < 0.001$) (Tabella 11).

Tabella 11. ANOVA relativa all'effetto del periodo di raccolta e della provincia.

	GL	VARIANZA	P
PROVINCIA, P	1	183.77	<0.001
RACCOLTA, R	2	31.07	<0.001
INTERAZIONE P x R	2	35.13	<0.001
ERRORE	924	1.71	<0.001

Grafico 2. Andamento della distribuzione in classi nei tre periodi di raccolta a Padova e Rovigo.



Dal Grafico 2 si può notare che per quanto riguarda la provincia di Padova, i tre periodi hanno avuto un effetto molto simile, risultando statisticamente uguali, dunque presentando un andamento lineare, in quanto tutti i campioni sono compresi tra la classe 5 e 6. Nella provincia di Rovigo, invece, l'effetto del periodo diminuisce, passando dal periodo 1 al

periodo 3, determinando un miglioramento della qualità della granella. In particolare gli ultimi due periodi di raccolta nella provincia di Rovigo risultano essere statisticamente uguali tra loro, ma entrambi diversi rispetto al primo periodo (3.41 vs. 4.91). L'andamento decrescente di Rovigo è totalmente inaspettato, in quanto il contenuto di aflatossina B1 dei campioni dovrebbe, al contrario, aumentare con il passare del tempo e la permanenza in campo o in magazzino della granella raccolta.

Tabella 12. ANOVA relativa all'interazione del periodo di raccolta e della provincia sui giorni di stoccaggio dei campioni prima dell'analisi.

	GL	VARIANZA	P
PROVINCIA, P	1	1137.13	0.0115
RACCOLTA, R	2	14020.47	<0.001
INTERAZIONE P x R	5	6671.24	<0.001
ERRORE	924	143.38	<0.001

Dalla Tabella 12 risulta come l'effetto dell'interazione tra il periodo di raccolta e la provincia abbia influito molto sui giorni di stoccaggio prima dell'analisi ($P < 0.001$). Infatti, la media dei giorni di stoccaggio è di 16.3 e questo può essere un altro fattore determinante che ha inciso sullo sviluppo di aflatossine durante la permanenza in laboratorio, soprattutto se le condizioni di conservazione (temperatura e umidità) non erano idonee.

In seguito è stato analizzato l'effetto dovuto all'interazione tra il comune e il periodo di raccolta (Tabella 13) che risulta essere molto significativo ($P < 0.001$).

Tabella 13. ANOVA relativa all'effetto del periodo di raccolta e del comune.

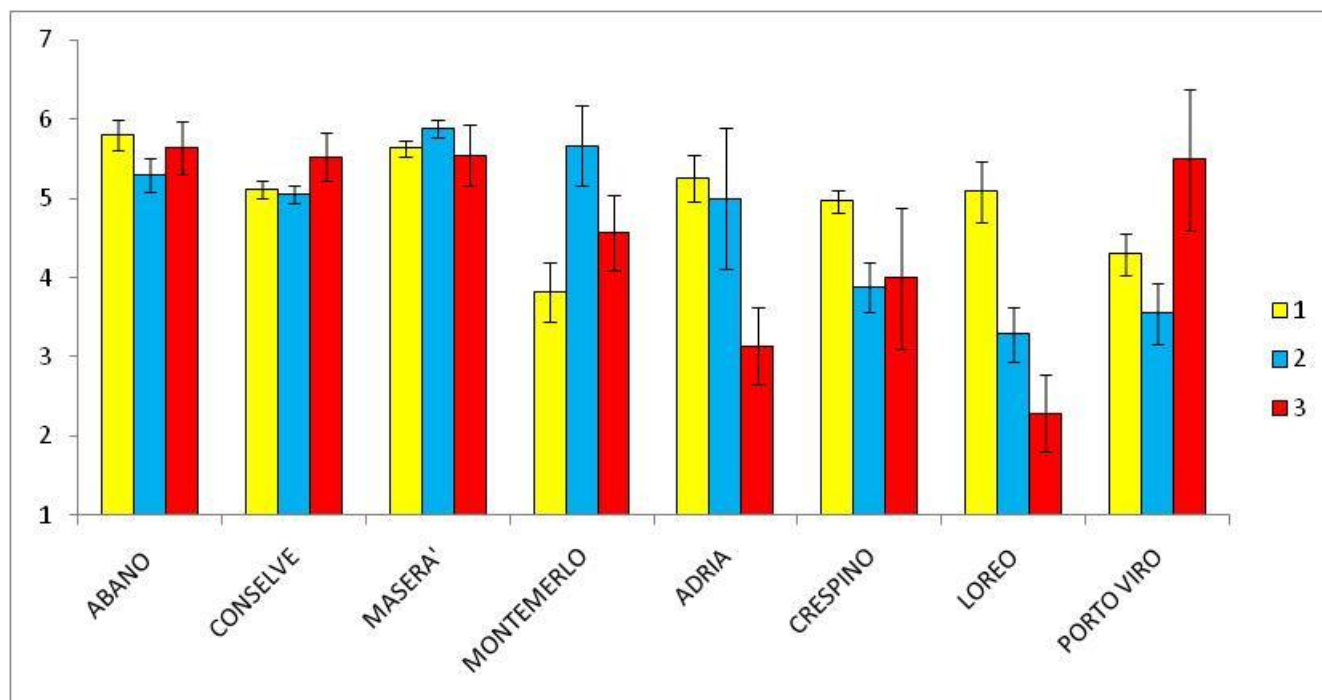
	GL	VARIANZA	P
COMUNE, C	7	20.59	<0.001
RACCOLTA, R	2	4.92	<0.001
INTERAZIONE C x R	14	7.66	<0.001
ERRORE	906	1.58	<0.001

Anche in questo caso è stata esclusa la provincia di Venezia per mancanza di variabilità, e per lo stesso motivo non sono stati considerati tutti i comuni appartenenti alle due province di Padova e Rovigo, ma solamente 4 comuni per ognuna.

Come si può notare dal Grafico 3, i comuni che appartengono alla provincia di Padova, cioè Abano, Conselve e Maserà hanno un andamento più o meno lineare, che rispecchia dunque quello generale della provincia (Grafico 2), mentre Montemerlo ha un andamento leggermente diverso, in quanto nel primo periodo i campioni rientrano tra la classe 3 e 4, diverso dunque dal periodo corrispondente nella provincia. Nel secondo periodo, invece, aumenta notevolmente la presenza della classe 5 e 6 tra i campioni, per poi diminuire ancora nell'ultimo periodo (classe 4 e 5).

Nella provincia di Rovigo i comuni di Adria, Crespino e Loreo rispecchiano l'andamento generale della provincia (Grafico 2), mentre nel comune di Porto Viro, nel primo periodo i campioni rientrano tra la classe 4 e 5, nel secondo periodo tra la classe 3 e 4 e infine nell'ultimo periodo c'è stato un notevole incremento dei campioni appartenenti alla classe 5 e 6 dunque presentando un andamento diverso rispetto a quello generale della provincia.

Grafico 3. Andamento della distribuzione in classi nei tre periodi di raccolta nei comuni di Padova e Rovigo.



4.3 Dati espressi in valore

Nell'analisi statistica per valutare l'effetto della provincia, del comune e del periodo sul contenuto di aflatoxina B1, espresso in ppb, sono stati escluse le due classi estreme, cioè la prima classe che comprende i valori < 1 ppb e la sesta con i valori > di 40 ppb, che rappresentano i limiti di rilevabilità del kit ELISA utilizzato, considerando dunque solo i campioni compresi tra la classe 2 e 5 (da 1 a 40 ppb).

4.3.1 Effetto della provincia e del comune

Nella Tabella 14 si evidenzia come l'effetto della provincia risulti significativo ($P=0.0338$) ai fini dell'analisi statistica. Si può inoltre notare che la provincia di Padova e Venezia risultano essere statisticamente diverse per quanto riguarda il contenuto in ppb di aflatoxina B1 (13.39 vs. 8.65). Per quanto riguarda la provincia di Rovigo presenta, invece, delle caratteristiche intermedie, mostrando una somiglianza statistica sia con la provincia di Padova che con quella di Venezia (Grafico 4).

Tabella 14. ANOVA relativa all'effetto della provincia.

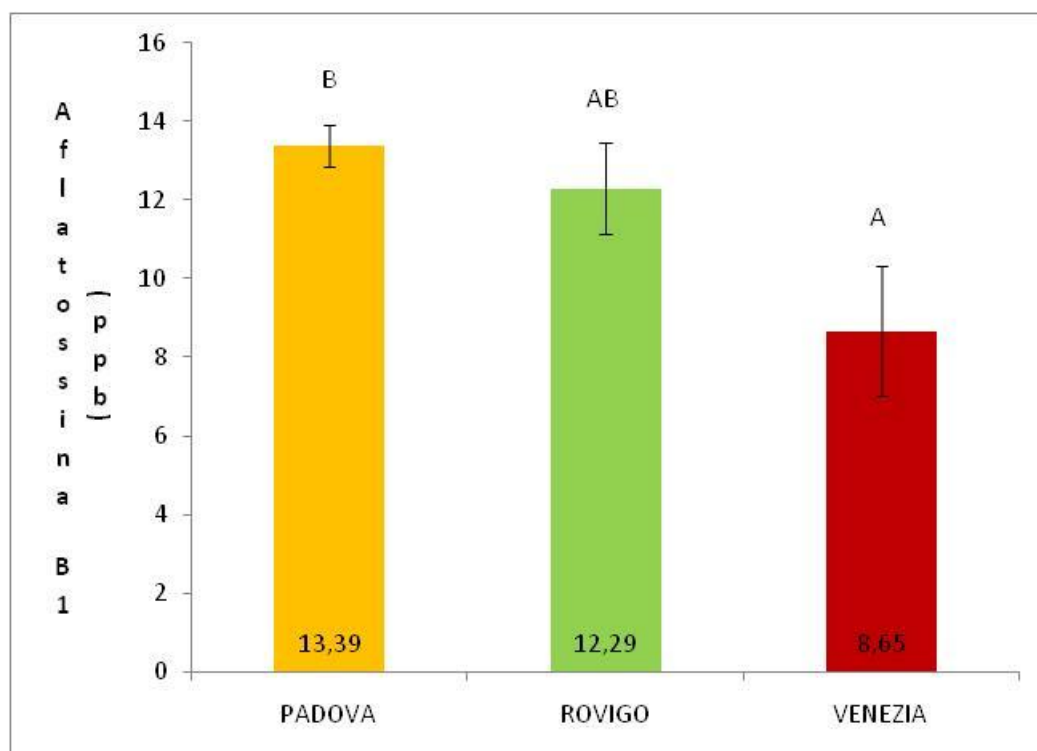
	GL	VARIANZA	P
PROVINCIA, P	2	446.64	0.0338
ERRORE	364	130.62	0.0338

Nella Tabella 15 si può notare come anche il comune di appartenenza risulta essere significativo ($P=0.0034$) per quanto riguarda la contaminazione da aflatossina B1 espressa in valore di ppb.

Tabella 15. ANOVA relativa all'effetto del comune.

	GL	VARIANZA	P
COMUNE, C	18	275.49	0.0034
ERRORE	348	124.94	0.0034

Grafico 4. Effetto della provincia sul contenuto di aflatossina B1 (ppb).



Nella Tabella 16 vengono riportati i valori di aflatossina B1 in ppb registrati nei diversi comuni delle tre province esaminate.

Il livello più elevato di contaminazione si riscontra a Rovigo, nel comune di Canda (24.23 ppb), mentre il livello più basso nella provincia di Venezia a Cavarzere (2.91 ppb).

Tabella 16. Effetto del comune sulla contaminazione da aflatossina B1.

PROVINCIA	COMUNE	LSMEAN	ERRORE STANDARD
PADOVA	ABANO	11.85	2.71
	CONSELVE	13.58	1.17
	CORREZZOLA	14.28	2.44
	MASERA'	16.27	1.77
	MONTAGNANA	6.99	2.38
	MONTEMERLO	19.94	3.53
	PIACENZA D'ADIGE	16.80	7.90
	POZZONOV	10.28	2.89
	STANGHELLA	11.80	4.56
ROVIGO	ADRIA	18.97	3.10
	ARIANO POLESINE	4.51	7.90
	CANDA	24.23	7.90
	CRESPINO	12.06	1.81
	GAIBA	10.47	3.53
	LOREO	8.17	2.79
	PORTO VIRO	12.17	2.99
VENEZIA	BRONDOLO	5.94	2.23
	CAMPAGNA LUPIA	14.02	2.63
	CAVARZERE	2.91	5.00

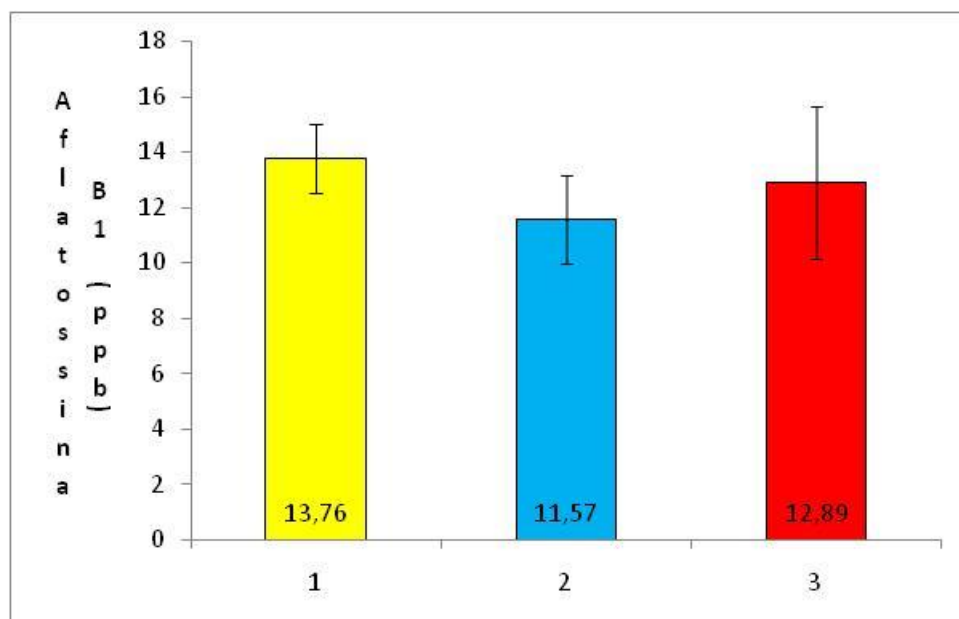
4.3.2 Effetto del periodo di raccolta

Tabella 17. ANOVA relativa all'effetto dell'interazione tra provincia e periodo di raccolta.

	GL	VARIANZA	P
PROVINCIA, P	1	878.21	0.0123
RACCOLTA, R	2	80.04	0.5599
INTERAZIONE P x R	2	173.36	0.2860
ERRORE	206	137.64	0.1082

L'effetto dell'interazione tra provincia e periodo di raccolta è risultato essere non significativo nell'analisi statistica (Tabella 17) sul livello di contaminazione ($P=0.2860$). Infatti, come si può notare dal Grafico 5, l'andamento del periodo è più o meno lineare per quanto riguarda il livello di presenza di aflatossina B1. Questo andamento, come precedentemente affermato, risulta essere anomalo, perché più la raccolta è tardiva più la granella dovrebbe essere contaminata dalle muffe, mentre in questo caso si riscontrano livelli abbastanza stabili di aflatossina.

Grafico 5. Effetto del periodo sul contenuto di aflatossina B1 (ppb).



Anche l'interazione tra i comuni e il periodo di raccolta, come riportato nella Tabella 18, non risulta essere significativa ($P=0.5276$) per determinare il contenuto di aflatossina B1 nella granella di mais.

Tabella 18. ANOVA relativa all'effetto dell'interazione tra comuni e periodo di raccolta.

	GL	VARIANZA	P
COMUNE, C	5	260.29	0.0999
RACCOLTA, R	2	80.04	0.5623
INTERAZIONE C x R	10	125.76	0.5276
ERRORE	194	138.63	0.3063

5. Conclusioni

L'analisi, che ha considerato 1241 campioni di granella di mais raccolti nel trimestre di agosto, settembre e ottobre 2012, ha confermato come l'annata agraria 2012 sia risultata particolarmente problematica per la contaminazione da aflatossina B1 nell'area del sud-est della regione Veneto. La contaminazione da aflatossina, considerando i valori ottenuti dalle analisi variabili da 1 ppb a 40 ppb, è risultata essere molto influenzata dall'area geografica (valori più elevati nella provincia di Padova rispetto a Rovigo e Venezia), ma al contrario non influenzata dal periodo di raccolta (seconda metà di agosto, prima di settembre e seconda di settembre). La stessa osservazione può essere effettuata anche per la suddivisione nelle 6 classi, ottenute considerando i valori stabiliti dalle normative europee, ma in questo caso anche il periodo di raccolta è risultato significativo. In modo inatteso il valore più elevato di contaminazione si è osservato nel primo periodo di raccolta. Questo risultato può essere parzialmente spiegato dal fatto che i campioni non sono stati analizzati subito dopo l'arrivo in laboratorio, ma mediamente dopo 16 giorni di stoccaggio.

In generale, i risultati di contaminazione della granella di mais raccolta nel 2012 sono in linea con i dati bibliografici che riportano come le condizioni climatiche abbiano influenzato in modo significativo lo sviluppo del fungo, considerata la forte siccità accompagnata da temperature e livelli di umidità molto elevati.

Per garantire una idonea qualità della granella, soprattutto dove l'ambiente presenta le caratteristiche pedo-climatiche idonee allo sviluppo di micotossine, è necessario adottare un'adeguata tecnica di coltivazione, di raccolta e di stoccaggio, ponendo particolare attenzione anche ai protocolli che regolano le procedure di campionamento e di analisi, al fine di ottenere risultati attendibili.

Per concludere, soprattutto in queste aree maggiormente vocate alla produzione di mais, che viene destinato principalmente alla produzione di alimenti zootecnici, sarebbe opportuno monitorare frequentemente il prodotto e adottare buone strategie di decontaminazione o pulitura, per migliorare la sanità della granella, o in alternativa, se il livello di contaminazione è troppo elevato, prevedere l'utilizzo del mais per altri scopi, come ad esempio utilizzarlo nei biodigestori per la produzione del biogas.

Bibliografia

- Agriok, 2003.** Aflatossina B1. Newsletter zootecnica (18): 1-4. Disponibile al sito: www.agriok.it.
- Anfuso F., Bailoni L., Bonino C., Causin R., De Liguoro M., Disegna L., Duso C., Furlan L., Gaspari E., Mosca G., Tealdo E. e Vio P., 2006.** Mais e sicurezza alimentare. Veneto Agricoltura, Azienda Regionale per i Settori Agricolo, Forestale e Agroalimentare. Disponibile al sito: <http://venetoagricoltura.regione.veneto.it>.
- Avogaro P., Bonciarelli F., Bonsembiante M., Cantarelli C., Cavalli R., Cera M., D'Ambra V., Doglioni A., Ferro O., Frilli F., Lanari D., Lechi F., Lucisano M., Mordenti A., Parigi Bini R., Piva G. e Toniolo L., 1983.** Il mais. Liviana Editrice, Padova, 13-55.
- Bailoni L., 2000.** Le Aflatossine. Sintesi del convegno sul tema "Aflatossine: sistemi di prevenzione tramite implementazione dell'autocontrollo aziendale (HACCP)", Reggio Emilia, 15 aprile 2000. Disponibile al sito: www.allevatori.net/veterinaria/convegno%20aflatossine.pdf.
- Barbiero A., Cortese L., Debattisti P. e Mazzero E., 2012.** Speciale Aflatossine. Utilizzare i prodotti di qualità per evitare contaminazioni nel latte e derivati. Cortal informa (31). Disponibile al sito: www.cortalruminanti.it.
- Battilani P., Pietri A. e Marocco A., 2006.** Micotossine, nuovi problemi e maggiore attenzione per il mais (*Zea mays*). Agronomica (3): 41-48.
- Bertocchi L., Scalvenzi A., Santini S. e Fusi F., 2012.** Aflatossine dal mais al latte?. Terra e Vita (39): 8-11.
- Bonciarelli F. e Bonciarelli U., 2001.** Coltivazioni erbacee. Calderini Edagricole-Edizioni Agricole, Bologna, 100-133.
- Brera C., 2012.** Cinque domande sulle aflatossine. A cura del Ministero della Salute, dell'ISS (Istituto Superiore di Sanità) e dell' EFSA (European Food Safety Authority). Disponibile al sito: www.iss.it/binary/efsa/cont/Aflatossine_Brera.pdf.
- Bugiani R., 2013.** Minimizzare la presenza di micotossine nella granella. Terra e Vita (14): 45-50.

- Causin R., 2013.** Cosa sapere per prevenire il rischio di aflatossine nel mais. Tecniche agronomiche e trattamenti post-raccolta. L'Informatore Agrario (3): 46-49.
- Circolare del Ministero della Salute, 14 settembre 2012.** Contaminazione da Aflatossine nel mais e nella catena alimentare. Inviata a: Regioni e Province autonome assessorato alla Sanità, Provincia autonoma di Bolzano ripartizione agricoltura, Comando dei Carabinieri per la tutela della salute, Istituti Zooprofilattici sperimentali, Istituto Superiore di Sanità, Mipaaf e alle Associazioni di Categoria. Disponibile al sito: www.azove.it.
- CRPV Soc. Coop. (Centro Ricerche Produzioni Vegetali), 2012.** Seminario a Bologna del 3 dicembre 2012. Quanto costa produrre latte e mais in Emilia-Romagna? La competitività di queste filiere. Disponibile al sito: <http://www.crpa.it>.
- De Paoli S., 2013.** Laboratorio ARAV (Associazione Regionale Allevatori del Veneto), analisi aflatossine 2012-2013. L'Allevatore Veneto (12): 15-16. Disponibile al sito: www.arav.it.
- Gerald N. e Wogan Ph. D., 1999.** Aflatoxin as a Human Carcinogen. Hepatology, vol. 30 (2): 573-575.
- Gorman D. P. e Kang M. S., 1991.** Preharvest Aflatoxin Contamination in Maize: Resistance and Genetics. Plant Breeding (107): 1-10.
- Lillehoj E. B. e Wall J. H., 1986.** Decontamination of Aflatoxin-Contaminated Maize Grain. In Aflatoxin in Maize, ed. CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo- International Maize and Wheat Improvement Center), El Batán, Mexico, 260-272.
- Maggiore T., Mariani L. e Verderio A., 2007.** Botanica e coltivazione. In Il mais, ed. ART Servizi Editoriali S.p.A., Bologna, 2-25 e 142-177.
- Moss M.O., 1998.** Recent studies in mycotoxins. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement (84): 62S-76S. Disponibile al sito: <http://onlinelibrary.wiley.com>.
- Naceur Haouet M. e Altissimi M. S., 2003.** Micotossine negli alimenti e micotossicosi animale e umana. Webzine Sanità Pubblica Veterinaria, numero 18. Disponibile al sito: www.spvet.it.
- Pietri A., Bernabucci U., Reyneri A. e Visconti A.** Come fronteggiare il problema aflatossina nel latte. Indicazioni agli allevatori per interventi nell'immediato. Comitato Scientifico AIA. Disponibile al sito: www.aia.it/lsl/download/relazioneaia.pdf, luglio 2013.

Regolamento CE n.165/2010 della Commissione del 26 febbraio 2010 recante modifica, per quanto riguarda le aflatossine, del regolamento (CE) n.1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 27 febbraio 2010, L50/8.

Regolamento CE n.1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 20 dicembre 2006, L364/5.

Regolamento CE n.401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 9 marzo 2006, L70/12.

Reyneri A., 2008. Micotossine del mais. Prevenzione e controllo. Disponibile al sito: www.glm.it.

Reyneri A., Visconti A., Avantaggiato G. e Blandino M., 2003. Linee guida operative per ridurre il rischio di contaminazione da aflatossine. Come fronteggiare il problema delle aflatossine nel latte. Comitato Scientifico AIA. Disponibile al sito: www.aia.it.

Rizzi N., 2006. Niente aflatossine nel silomais lombardo. L'Informatore Agrario (39): 60-63.

Rizzi N., 2008. Basso rischio micotossine nelle ultime campagne. Supplemento a L'Informatore Agrario (11): 5-6.

Rosiles M. R., 1986. Mycotoxicoses in Farm Animal. In Aflatoxin in Maize, ed. CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo - International Maize and Wheat Improvement Center), El Batan, Mexico, 66-69.

Sarasin A. e Moulé Y., 1975. Translational Step Inhibited *in vivo* by Aflatoxin B1 in Rat-Liver Polysomes. Eur. J. Biochem, 54: 329-340.

SAS (Statistical Analysis System Institute Inc), 1991. User's Guide, Statistics, Version 9.2. Edition SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Sauer D.B., 1986. Conditions that affect growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in stored maize. In Aflatoxin in Maize, ed. CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo - International Maize and Wheat Improvement Center), El Batan, Mexico, 41-47.

Soldà G., 2012. Monitoraggio della contaminazione da micotossine in campioni di granella di mais raccolti nell'arco di un triennio in diverse aree dell'Italia nord-orientale. Relatore Bailoni L., Correlatore Guadagnin M., Dipartimento Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Padova, Legnaro.

Siti internet utilizzati:

eur-lex.europa.eu, giugno 2013.

<http://www.iarc.fr/>, luglio 2013.

www.aia.it, luglio 2013.

www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?languages/english.php~mian, luglio 2013.

www.istat.it, luglio 2013.

www.mondolatte.it/index.php/foraggi/91-le-micotossine, luglio 2013.

www.usda.gov, luglio 2013.